

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра промислової біотехнології

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«__» _____ 2020 р.

Дипломний проєкт

на здобуття ступеня бакалавра

за освітньо-професійною програмою «Промислова біотехнологія»

спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

**на тему: «Технологія виробництва іммобілізованого ензиміотика
косметичного призначення. Дільниця підготовки посівного матеріалу»**

Виконав (-ла):

студент (-ка) IV курсу, групи БТ-62

Скобелева Софія Романівна _____

Керівник:

Зав. каф. промислової біотехнології, д.т.н., доц.

Тодосійчук Тетяна Сергіївна _____

Консультант з Розділу 5. Розрахунок обладнання для проведення
технологічного процесу:

Ст. викл. каф. біотехніки та інженерії, к.т.н

Фесенко Сергій Вікторович _____

Рецензент:

Ст. викладач каф. екобіотехнології та біоенергетики, к.т.н.

Жукова Вероніка Сергіївна _____

Засвідчую, що у цьому дипломному
проєкті немає запозичень з праць інших
авторів без відповідних посилань.

Студент (-ка) _____

Київ – 2020 року

ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЄКТУ

№ з/п	Формат	Позначення	Найменування	Кількість листів	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проєкт	2	
2	A4	ДП 6215. 00.000 ПЗ	Пояснювальна записка	120	
3	A1	ДП 6215. 01.000 ТК	Технологічна схема	1	
4	A1	ДП 6215. 02.000 ТК	Апаратурна схема	1	
5	A1	ДП 6215. 03.000 ТК	Інокулятор	1	

				ДП 6215 00.000.00		
	ПБ	Підп.	Дата	Відомість дипломного проєкту	Лист	Листів
Розробн.	Скобелева С.Р.				1	1
Керівн.	Тодосійчук Т.С				КПІ ім. Ігоря Сікорського Каф. ПБТ Гр. БТ-62	
Консульт.						
Н/контр.						
Зав.каф.	Тодосійчук Т.С.					

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра промислової біотехнології

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Промислова біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Тетяна ТОДОСІЙЧУК

«_27_» лютого 2020 р.

ЗАВДАННЯ
на дипломний проєкт студенту
Скобелєвій Софії Романівні

1. Тема проєкту «Технологія виробництва іммобілізованого ензиміотика косметичного призначення. Дільниця підготовки посівного матеріалу», керівник проєкту Тодосійчук Тетяна Сергіївна, д.т.н, доц., затверджені наказом по університету від «21» травня 2020 р. № 1125-с

2. Термін подання студентом проєкту _____

3. Вихідні дані до проєкту: штам *Streptomyces albus* 2435/M; інокулятор - об'єм 0,4 м³; параметри культивування: t = 28 °С, перемішування n = 220 об/хв; кінцевий продукту – іммобілізований ензиміотик.

4. Зміст пояснювальної записки: підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва комплексу гідролітичних ензимів; провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проєкті; визначити основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва; скласти матеріальний баланс виробництва, розробити технологічну і апаратурну схему; обґрунтувати вибір конструкції

інокулятора, здійснити технологічний, конструктивний та тепловий розрахунки.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): креслення загального виду інокулятора – 1 арк.

A1, технологічна схема – 1 арк. A1, апаратурна схема – 1 арк. A1

6. Консультанти розділів проекту

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 5	Фесенко С.В., ст. викл. каф. біотехніки та інженерії		

7. Дата видачі завдання _____

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1.	Характеристика біологічного агента	27.02.20-25.03.20	
2.	Біохімічні основи виробництва	25.03.20-15.04.20	
3.	Методи отримання промислових продуцентів	15.04.20-30.04.20	
4.	Технологічна частина	30.04.20-15.05.20	
5.	Технологічна схема	30.04.20-15.05.20	
6.	Складання апаратурної схеми	15.05.20-30.05.20	
7.	Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу	15.05.20-30.05.20	
8.	Оформлення пояснювальної записки	30.05.20-05.06.20	

Студент

Софія СКОБЕЛЄВА

Керівник

Тетяна ТОДОСІЙЧУК

Пояснювальна записка
до дипломного проєкту
на тему: «Технологія виробництва іммобілізованого
ензибіотика косметичного призначення. Дільниця
підготовки посівного матеріалу»

Київ – 2020 року

РЕФЕРАТ

Дипломний проект містить с. 120, рис.11 , табл.6, дод. 3, посилань 76.

Робота присвячена технології виробництва іммобілізованого ензиміотику косметичного призначення та діляниці підготовки посівного матеріалу.

Мета роботи: розробка ефективної технології виробництва іммобілізованого ензиміотику з провідною протеолітичною та літичною активністю для використання як компонента функціональних косметичних засобів.

В якості продуцента використовували штам актиноміцетів *Streptomyces albus* 2435/М, отриманий генетико-селекційними методами.

На основі фізіолого-біохімічних характеристик продуцента було обрано посівний ферментер із механічним перемішуючим пристроєм та барботером, які забезпечують надходження кисню до культури та ефективний масообмін в ході виробничого біосинтезу.

Для виділення та очистки продукту було запропоновано абсорбційний спосіб із використанням аеросилу, з подальшим висушування продукту розпилювальним способом.

Розроблено технологічну та апаратурну схему виробництва іммобілізованого ензиміотику у відповідності до вимог до готової форми та якості продукту.

ЕНЗИБІОТИК, ЛІТИЧНІ ТА ПРОТЕОЛІТИЧНІ ФЕРМЕНТИ,
ПОСІВНИЙ МАТЕРІАЛ, БІОСИНТЕЗ, *STREPTOMYCES ALBUS* 2435/М,
ФЕРМЕНТЕР, ІММОБІЛІЗАЦІЯ, АЕРОСИЛ.

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РЕФЕРАТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Скобєлєва С.Р.					Д	5	120
Консультант						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник	Тодосіючук Т.С.					ФБТ		
Затверд.								

ABSTRACT

The diploma project contains p 120. , fig. 11, table. 6, ad. 3, links 76.

The work is devoted to the technology of production of immobilized antibiotic for cosmetic purposes and the site of seed preparation.

Purpose: to develop an effective technology for the production of immobilized antibiotic with a leading proteolytic and lytic activity for use as a component of functional cosmetics.

As a producer used a strain of actinomycetes *Streptomyces albus* 2435/M, Obtained by genetic selection methods.

Based on the physiological and biochemical characteristics of the producer, a seed fermenter with a mechanical stirring device and a bubbler was selected, which ensure the supply of oxygen to the culture and efficient mass transfer during production biosynthesis.

For the isolation and purification of the product, an absorption method using aerosil was proposed, followed by spray drying of the product.

The technological and hardware scheme of production of immobilized antibiotic in accordance with the requirements to the finished form and quality of the product is developed.

ENZYBIOTICS, LYTIC AND PROTEOLYTIC ENZYMES, SEED MATERIAL, BIOSYNTHESIS, *STREPTOMYCES ALBUS* 2435/M, FERMENTER, IMMOBILIZATION, AEROSIL.

					ДП 6215 00 000 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.	Скобелева С.Р.				Стадія	Аркуш	Аркушів
Консультант					Д	6	120
Керівник	Тодосіючук Т.С.				КПІ ім. Ізгоря Сікорського		
Затверд.					ФБТ		

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА.....	11
1.1 Основні промислові продуценти.....	11
1.2 Систематичне положення.....	13
1.3 Морфолого-цитологічні ознаки.....	13
1.4 Культуральні ознаки.....	15
1.5 Фізіолого-біохімічні показники.....	18
1.6 Поширення в природі.....	22
РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА.....	25
2.1 Характеристика кінцевого продукту.....	25
2.2 Основні хімічні перетворення процесу.....	28
2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології.....	32
2.4 Методи очистки цільового продукту.....	35
2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси.....	39
РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ.....	42
3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	42
3.1.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту.....	42
3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу.....	44
3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту.....	46
3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів (без використання мутагенів та з використанням мутагенів).....	46

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ЗМІСТ	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Скобєлева С.Р.				П	7	120
Консультант						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тодосіючук Т.С.						
Затвер.								

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу.....	47
3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі.....	48
РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА.....	50
4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва.....	50
4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві.....	52
4.3 Опис технологічного процесу.....	56
4.4 Матеріальний баланс.....	71
4.5 Контроль виробництва.....	73
4.6 Технологічна схема виробництва.....	76
РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ.....	77
5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату.....	77
5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки.....	85
5.2.1 Розрахунок реактора.....	86
5.2.2 Розрахунок глибини воронки.....	88
5.2.3 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування.....	89
5.2.4 Розрахунок потужності привода мішалки.....	91
5.2.5 Тепловий розрахунок реакторів.....	99
5.2.6 Розрахунок процесу перемішування в системах рідина-газ і рідина- тверде тіло.....	97
5.3 Вибір загальнозаводського обладнання.....	101
5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.....	101
ВИСНОВОК.....	109
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	110
Додаток А.....	118
Додаток Б.....	119
Додаток В.....	120

ВСТУП

Одним із важливих завдань сучасної біотехнології є розвиток мікробіологічного синтезу продуктів. Провідне місце серед таких досліджень займають ферменти мікробного походження.

Ферменти мікробного походження мають велике значення в різних галузях промисловості – у харчовій, медичній, текстильній, хімічній: для отримання чистих амінокислот і рідкісних цукрів, фруктози та інших з'єднань, в тонкому хімічному синтезі. Літичні ферменти набули велике практичне значення, оскільки їх застосування зумовлене їх здатністю до часткового або повного руйнування мікробних клітин. Вони використовуються в якості антимікробних компонентів, засобів з антисептичними та дезінфікуючими властивостями, як миючі та косметичні засоби.

Продуцентами ферментів - протеаз, амілаз, фосфатаз, целлюлаз, пектіназ, глюкозооксидази, ліпаз, каталази - служать багато міцеліальні гриби, деякі актиноміцети і бактерії. Зазвичай в якості продуцентів використовують рекомбінантні штами відомих грибів і бактерій родів *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Bacillus* і ін.

Такий мікробіологічний синтез перевершує хімічний та поступово витісняє його. «Зелена альтернатива», заснована біотехнологією, все більш успішно замінює традиційні хімічні процеси.

Для виробництва та отримання ферментних препаратів, які б були більш ефективні та стабільні, зручні у використанні та зберігали свої властивості протягом більшого часу, було запропоновано метод іммобілізації. Іммобілізація ферментів значно спрощує процес регенерації (багаторазового використання), поліпшує протікання біокаталізу та знижує експлуатаційні витрати.

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Стадія	Аркуш	Аркушів
Разроб.		Скобелева С.Р.				Д	9	120
Консультант						КПІ ім. Ігоря Сікорського		
Керівник		Тодосічук Т.С.				ФБТ		
Затверд.								

Отримання чистих ферментних препаратів пов'язане зі значними технологічними труднощами, що значно впливає на їх собівартість. Для зниження ціни на продукт та вдосконалення біотехнологічних рішень виробництва було запропоновано використовувати комплексні препарати.

Актуальність роботи обумовлюється відсутністю вітчизняного виробництва літичних та гідролітичних препаратів, розробкою нових технологічних особливостей процесу та реалізацію у промисловість. У подальшому розробкою нових методів модифікації ферментів та нових препаратів з високою активністю ферментного комплексу та контрольованою специфічністю.

Тому, метою роботи була розробка ефективної технології виробництва іммобілізованого ензиміотику з провідною протеолітичною та літичною активністю для використання як компоненту функціональних косметичних засобів. В якості продуцента використовували штам актиноміцетів *Streptomyces albus* 2435/M., отриманий генетико-селекційними методами.

Завданнями, які поставлені для досягнення даної мети, є:

- порівняння мікроорганізмів, що можуть бути використані для отримання комплексу гідролітичних ензимів та вибір найбільш перспективного, встановлення його морфологічних та фізіолого-біохімічних ознак, аналіз способів створення високопродуктивних промислових продуцентів;
- визначення фізико-хімічних характеристик цільового продукту та особливостей технології, що ними обумовлюються;
- порівняння способів виділення і очистки продукту та обґрунтування вибору оптимальної технології за критеріями ефективності, економічності, безпеки та простоти реалізації;
- розробка технологічної та апаратурної схем виробництва;
- обґрунтування вибору інокулятора, розрахунок його конструкційних особливостей.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						10
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

1.1 Основні промислові продуценти

Літичні ферменти набули велике практичне значення, оскільки їх застосування зумовлене їх здатністю до часткового або повного руйнування мікробних клітин [1].

Гідролітичний ферментний комплекс містить ферменти, здатні руйнувати клітинні стінки багатьох грампозитивних коків, паличок, грамнегативних бактерій та дріжджових організмів. Максимальна бактеріолітична дія виявляється по відношенню до мікроорганізмів, що належать до родів *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Lactobacillus*. У складі ферментного комплексу ідентифіковані специфічні літичні петидази та протеази, мурамілази та гексозамінідази. Окремі ферменти комплексу «проявляються фібрінолітичну, колагеназну, еластазну та гіалуронідазну активність. Ці властивості дозволяють застосовувати гідролітичний ферментний комплекс як медичну субстанцію при створенні препаратів поверхневої дії для санації інфікованих ран різного походження, препаратів хірургії та отоларингології, косметичних засобів [2].

Однією з найпоширеніших груп промислових продуцентів різних біологічно активних речовин є актиноміцети, серед яких найбільш відомі мікроорганізми, що продукують антибіотики та ферменти. Велика кількість таких мікроорганізмів належить до роду *Streptomyces* [3].

Особливістю продуцентів цієї групи ферментів є біосинтез не окремих речовин, а ферментних комплексів, що містять декілька індивідуальних ферментів, але максимальну активність виявляють при сумісній дії.

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб	Скобєлева С.Р.					Д	11	120
Консультант						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Тодосієчук Т.С.							
Затверд.								

Бактеріолітичний ферментний комплекс, продуцентом якого є культура актиноміцета *Streptomyces albus* (*S. recifensis* var. *Lyticus*) містить літичні ендопептидази, глікозидази, протеїнази, мурамідази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектру мікробних клітин.

Одним з найкращих продуцентів гідролітичного ферментного препарату є штам *S. albus* 2435, що характеризується помітною мінливістю та нестабільністю біосинтетичної здібності (а разом з тим і зміною характеристик продукту) та значною тривалістю процесу біосинтезу (до 70 годин). Рівень цільової (літичної) активності ферментного комплексу при вирощуванні штаму - 3-5 тис. одиниць/мл по відношенню до різних тест-культур - в умовах виробництва, внаслідок вказаних ознак, зазнає значних коливань, що обмежує можливість використання штаму як промисловий продуцент.

Дослідження культури впродовж останніх десяти років дозволили вивчити біологічні властивості селекціонованих штамів та визначені можливі напрямки застосування препаратів на його основі [4].

В ході селекції культури отримані високоактивні штами *S. albus* 2435, була встановлена здатність культури синтезувати також антибіотики з переважаючою фунгістатичною дією. Таке поєднання у спектрі продуктів культури антибактеріальних ферментів та фунгістатичного антибіотику відкриває перспективи отримання комбінованих антисептиків широкої специфічності безпосередньо в ході біотехнологічного виробництва [5].

Одержаний мутантний штам *S. albus* має вищий рівень накопичення літичної активності, у порівнянні з відомим штамом та більш швидкий процес біосинтезу, що відображається на економічності отримання ферментного препарату. Завдяки мутагенній обробці досягнуто не лише інтенсифікацію біосинтетичних процесів культури, а також збільшення питомої активності ферментного комплексу, про що свідчить майже однаковий вміст білку в культуральній рідині поряд з підвищенням цільової активності.

Штам *S. albus* 2435 здатний синтезувати комплекс літичних ферментів, який лізує не тільки вбиті, а й живі клітини стафілокока, при заміні

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						12
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

специфічних індукторів композицією іонів металів досконалення методів їх отримання [6].

Отже, доцільно обрати штам *S. albus* 2435/М, який є більш продуктивним у порівнянні з відомим штамом (у 1,5-2 рази), має меншу тривалість процесу біосинтезу та є значно економічним при отримання ферментного препарату.

1.2 Систематичне положення

У данній роботі використовується продуцент *Streptomyces albus* 2435/М, первісно ідентифікований як *Streptomyces recifensis* var *lyticus*.

S. albus 2435/М є представником *Streptomyces* – роду бактерій родини *Streptomycetaceae* порядку актиноміцетів (*Actinomycetales*) класу *Thallobacteria* типу *Firmicures* царства *Eubacteria*.

Оскільки *S. albus* 2435/М відноситься до роду *Streptomyces*, у 9 виданні визначника Берджі продуцент належить до групи №25: «Стрептоміцети та близькі роди: Рід *Streptomyces*».

Категорія – грам-позитивні еубактерії. Актиноміцети: Група 25. Стрептоміцети та близькі роди: Рід *Streptomyces* [7].

1.3 Морфолого-цитологічні ознаки

Актиноміцети - це тип грампозитивних бактерій з високим вмістом G + С. Серед грампозитивних бактерій актиноміцети демонструють найбільш багату морфологічну диференціацію, яка заснована на ниткоподібної ступеня організації, подібної нитчастим грибам.

Морфологічні характеристики актиноміцетів є основою і інформацією філогенезу. Класичні актиноміцети мають добре розвинений радіальний міцелій, який може бути розділений на субстратний міцелій і повітряний

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						13
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

міцелій в залежності від морфології і функції. Деякі актиноміцети можуть утворювати складні структури, такі як спору, ланцюжок спори, спорангію [8].

Актиноміцети мають різні культурні особливості в різних типах поживних середовищ, які важливі при ідентифікації класифікації, зазвичай зі спорами, повітряними гіфами, з кольором або без нього і розчинним пігментом, в якості основних характеристик відрізняються умови зростання на різних середовищах. Морфологічна диференціація актиноміцетів, особливо стрептоміцетів, контролюється відповідними генами. І морфогенез, і продукування антибіотиків в стрептоміцетами ініціюються у відповідь на голодування, і ці події пов'язані.

Стрептоміцети, найбільш широко використовувана група серед актиноміцетів, входять до підпорядку, *Streptomycineae*, родини *Streptomycetaceae*. Вони мають клітинну стінку типу 1 і вміст G + C приблизно від 69 до 78 мол.%. Вони варіабельні у харчуванні і можуть аеробно розкласти складні речовини, такі як пектин, лігнін, хітин, кератин, латекс та ароматичні сполуки. *Streptomyces* найбільше відомі своїм синтезом величезного ряду антибіотиків, деякі з яких корисні в медицині та сільському господарстві [9].

Продуцент *S. albus* 2435/M відноситься до роду *Streptomyces*, який є найбільшим родом сімейства. Види роду *Streptomyces* характеризуються здатністю утворювати вегетативні гіфи, який має діаметр 0,5-2,0 мкм, та утворюють розгалужений міцелій, рідко розпадається на фрагменти. Повітряний міцелій може бути пластівчастим, зернистим, порошкоподібною або оксамитовим. У зв'язку зі здатністю утворювати пігменти різного кольору субстратної і повітряний міцелій можуть бути різноманітно пофарбовані. У зрілому стані міцелій несе ланцюжки з трьох або більше спор. За Грамом бактерії роду *Streptomyces* відносяться до Грампозитивні, але не кислото- та спиртостійкі [10].

Гіфи повітряного міцелію покриті гідрофобним чохлам, мають велику товщину і світлозаломлюваність в порівнянні з гіфами первинного міцелію [7].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						14
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

У *Streptomyces* життєвий цикл починається з проростання спор і розростанням міцелію подачі субстрату. У відповідь на харчові і інші стресові сигнали *Streptomyces*. виробляють репродуктивні повітряні гіфи, які піддаються клітинного ділення з утворенням спор.

Спори нерухомі, овальні, розташовані на спороносіях. Різні стрептоміцети розрізняються за формою і розташуванню спороносіїв. Вони можуть бути прямі, спіралеподібними, вигнутими, мати мутовчате, послідовне і супротивне розположення. Для деяких представників характерні короткі ланцюжки спор на субстратному міцелію. Деякі види здатні формувати склероціо-, пікнідіо-, спорангіо-, сінемаподібні структури [7,11].

Поверхнева структура спор у різних видів неоднакова. Спостерігається гладка поверхня і з різними виростами у вигляді шипиків і ворсинок. Ці морфологічні ознаки досить ефективно використовуються в класифікації видів [11].

Проростки спор та фрагменти міцелія утворюють гіфи, що проникають в агар (субстратний міцелій), а також гіфи, які багаторазово розгалужуються та щільно переплітаються на поверхні агару, що утворює щільні шкіряні колонії [10].

1.4 Культуральні ознаки

Актиноміцети є досить варіабельними мікроорганізмами, вони мають різну форму, колір та розміром, відрізняються вимогливістю до поживного середовища. За формою та розміром молоді колонії більш тонкі, плоскі і круглі, можуть цілком знімаються з поверхні середовища петлею. Розмір колонії – 0,3-0,5 мм, вони схожі на бактеріальнію Зрілі культури – гладкі та смугасті, складчасті або горбисті, м'якої воскоподібної або крихтоподібної консистенції. Вони міцніше з'єднуються з поживним середовищем за допомогою густих або пухких відростків. Розмір зрілих колоній приблизно 1 - 1,5 мм.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						15
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Поверхня колоній різноманітна: гладка, оксамитова, пухнаста або борошниста. Останнє пов'язано з утворенням повітряного міцелію колоній є досить характерною ознакою актиноміцетів.

Характерною ознакою для актиноміцетів є пігментація колоній, кольори варуються від темно-фіолетового, синього, червоного, пурпурного, помаранчевого, жовтого, зеленого, бурого, чорного, сірого або білого кольору з різними відтінками. Пігменти поділяються також на розчинні та нерозчинні у воді, спирті або нерозчинні ні у воді, ні в органічних розчинниках.

У хромофорних актиноміцетів забарвлюється тільки колонія, а поживний субстрат під нею та навколо неї залишається такими як й був. Це пояснюється тим, що в них пігмент утворюється в протопласті, розташовуючись зернятками по всій нитці. Зазвичай актиноміцети володіють одним або двома пігментами та буро забарвлюючою речовиною, характерною багатьма актиноміцетам.

Колонії покриті повітряним міцелієм – вільні гіфи, які мають гідрофобну оболонку та зростають вертикально вгору від поверхні колонії. Ці гіфи спочатку не зафарбовані, але коли починається дозрівання спор, вони набувають різне забарвлення. На цій стадії колонії стрептоміцетів стають порошкоподібними або бархатистими, та їх легко відрізнити від типових бактеріальних колоній [7].

Штам добре зростає на середовищах для актиноміцетів: Красильнікова СР-1, Гаузе-мінеральна №1, модифіковане Чапека та деяких інших. Це зображено на таблиці 1.1:

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						16
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Таблиця 1.1 - Морфологія органів плодоношення штаму *Streptomyces albus* 2435/М при вирощуванні на різних середовищах

Середовище	Діаметр та форма колонії	Повітряний міцелій	Субстратний міцелій	Розчинність пігмента, колір
Красильнікова СР-1	d=5-6 мм; неправильної форми з щільним центром	Попелястий	Попелястий	Відсутній
Гаузе-мінеральна №1	d=3-5 мм; круглі, випуклі, дещо складчасті	Від білого до світло-сірого	Безбарвний	Розчинний
Середовище Чапека	d=5-6 мм; плоскі з центричними кільцями	Світло-сірий	Безбарвний	Відсутній
Вівсяний агар	d=5-7 мм; випуклі	Світло-сірий, рожево-сірий, синювато-сірий	Безбарвний	Відсутній
Глюкозо-аспарагіновий агар	d=2-4 мм; випуклі складчасті, центр провалений, край фестончастий	Світло-сірий з відтінком жовтого	Безбарвний	Відсутній

Вирощування штаму відбувається на модифікованому середовищу Чапека при температурі 28°C протягом 48-60 годин. Наприкінці росту утворюється пластівцевовидний міцелій, який заповнює 2/3 об'єму

середовища. Культуральна рідина легко розділяється при відстоюванні, має запах дусту [6].

1.5 Фізіолого-біохімічні ознаки

Тип живлення у представників актиноміцетів – хемоорганотрофи. Актиноміцетів мають рідкі метаболічні шляхи і ферментні системи. Наприклад, одним з таких є шлях Ентнера-Дудорова, який розщеплює глюкозу. Зустрічається поліфосфатгексокіназа (замість звичайної гексокінази), існують особливості в синтезі ряду амінокислот; у вторинному метаболізмі їм властивий шікіматний шлях синтезу ароматичних сполук, включення цілісних вуглецевих скелетів глюкози у вторинні метаболіти, наприклад, антибіотики.

Актиноміцети здатні до синтезу різних фізіологічно-активних речовин, пігментів, антибіотиків, пахучих сполук тощо. Завдяки деяким з таких сполук, наприклад геосмін, аргосмін, муцідон, 2-метил-ізоборнеол, формується специфічний запах ґрунту. Актиноміцети є активними продуцентами антибіотиків, утворюючи до половини відомих науці.

Всі стрептоміцети невибагливі щодо поживних речовин і не потребують особливих факторів росту. Найкращим джерелом вуглецю для розвитку і утворення антибіотика вважається глюкоза. Також актиноміцет добре росте на середовищах з фруктозою, галактозою, ксилозою, мальтозою, лактозою і крохмалем, але не росте на середовищах з сахарозою, арабінозою, сорбітом, дульцитом або інозитом [7].

Майже всі штами можуть використовувати тваринні жири, рослинні масла або вищі жирні кислоти на середовищах, що не містять глюкозу. Всі спирти, за винятком маніта і гліцерину, непридатні для зростання актиноміцета і синтезу антибіотика.

З органічних кислот – молочної, піровиноградна і лимонна стимулюють утворення стрептоміцину. Використання суміші яблучної і янтарної кислот на

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						18
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

середовищі, що містить основні амінокислоти, сприяє значному збільшенню продукції антибіотика [7,10].

Основними джерелами азотного живлення є амонійні солі та амінові кислоти: відновлюють нітрат до нітриту, розкладають аденін, ескулін, казеїн, желатин, гіпоксантин, крохмаль і L-тирозин [11].

Посилення утворення антибіотику відбувається при додаванні в середу сечовини, гуанідину, аргініну і інозиту.

Збільшення концентрації фосфору в середовищі до 0,04-0,07 мг/мл підсилює вироблення антибіотику, подальше ж підвищення вмісту фосфору знижує утворення антибіотика.

Максимальний вихід стрептоміцину спостерігається при вмісті в середовищі 0,0007-0,005% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Збільшення концентрації заліза, а також цинку (до 0,05%) сильно пригнічує утворення антибіотику [12].

Всі представники роду *Streptomyces* за відношенням до кисню є облігатними аеробами.

В основному представники роду – сапрофіти. Здатні активно розвиватися в посушливих умовах [10,11].

Оптимальна температура розвитку +25°C-+35°C. Деякі види ростуть як психрофільні і термофільні. Оптимальна кислотність знаходиться в діапазоні рН 6,5-8,0.

Для вирощування актиноміцетів використовують поживні середовища Красильнікова СР-1, Гаузе-мінеральна №1, модифіковане Чапека та деяких інших. Забарвлення субстратного міцелію коливається від світло-жовтого до світло-коричневого.

Зростають на звичайних бактеріологічних середовищах – м'ясо-пептоному агарі, триптиказо-соевому агарі, кров'яному агарі та навіть на агаризованому середовищі з серцево-мозкова витяжка. Наприклад, спочатку інкубують на багатому живильному середовищі, але при цьому враховують, що при цьому відбувається атипічний ріст – щільні шкіряні колонії, присутній повітряний міцелій та без клубочків спор.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						19
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Посівний матеріал вирощують на рідкому середовищі Чапека (таблиця 1.2) у колбах об'ємом 250 мл, 100 мл з яких займає поживне середовище, на качалках при частоті обертання 220 хв^{-1} протягом 48 год при температурі 28°C . Середовища Чапека має рН середовища 6,8-7,0; стерилізацію проводять при 1 атм. (121°C), час - 20 хвилин.

Таблиця 1.2 – Компонентний склад середовища Чапека

Компонент	Концентрація, г/л
вода дистильована	1000,0
нітрат натрію (NaNO_3)	2,0
фосфат калію двозаміщений (K_2HPO_4)	1,0
сульфіт магнію (MgSO_4)	0,5
хлорид калію (KCl)	0,5
сульфіт заліза (FeSO_4)	0,1
агар-агар	20,0

Для біосинтезу ферментного комплексу використовували базове середовище (рН = 7,8—8,2) наступного складу (г/л) показане у таблиці 1.3:

Таблиця 1.3 – Середовище для біосинтезу ферментного комплексу

Компонент	Концентрація, г/л
глюкоза	6,0
соєве борошно дезодороване	8,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,8
NaCl	14,0
CaCl_2	4,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,04
H_2O дист.	До 1 л

Біосинтез проводили у колбах на 1000 мл, 150 мл ферментаційного середовища, на качалках при частоті обертання 220 хв^{-1} протягом 72—96 год при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Продуцент вирощували в глибинних умовах.

Можливі й альтернативні варіанти – використання меляси, як поживного середовища. Меляса має складний і не постійний хімічний склад, до якого входять азотисті сполуки, переважно аміді, вуглеводи, зола (мінеральні речовини) та мікроелементи. Як мінеральні речовини в мелясі містяться K_2O , MgO , CaO .

За такого складу культура отримує збалансоване харчування по всіх необхідних компонентах, ростові речовини.

Застосування меляси замість глюкози у складі поживного середовища дає можливість підвищити продуктивність культури актиноміцета в 1,5—2 рази при зниженні вартості середовища у 1,3 разу [13].

Для росту культури необхідна аерація, тому при вирощуванні на скошеному агарі кришки закривають не щільно, деякі штами потребують газообміну, в таких випадках використовують ватно-марлеві пробки.

Зростають при нижчій вологості ніж грамнегативні бактерії, що дає можливість використовувати різну кількість агара в середовищі, від 1,5-2,0 до 3,0% (маса/об'єм) для культивування штамів [7].

Розмножуються стрептоміцети спорами. Розвиток виду починається з проростання спори. У різних ділянках спори проростають різною кількістю гіф, від однієї до чотирьох. Гіфи подовжуються, розгалужуються і розростаються в субстратної (первинний) міцелій, вростають в середу і формує колонії. На поверхні колонії розвивається вторинний (повітряний) міцелій. Він більш пухкий [9].

Спори формуються тільки на спороносіях повітряного міцелію. Утворення спор йде шляхом фрагментації або сегментації. В обох випадках спочатку спостерігається реплікація одного або більше нуклеоїдів, потім вони рівномірно розташовуються уздовж гіфи. Навколо них відокремлюється

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						21
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

цитоплазма і кожна окрема ділянка покривається цитоплазматичною мембраною. Таким чином, формуються проспори [11].

При фрагментаційному способі утворення проспори покриваються другою власною оболонкою і перетворюються в зрілі спори. Оболонка спорангія деякий час зберігається, потім вона руйнується, і звільняються ланцюжка спор. У відповідних умовах вони проростають і дають початок новому циклу. При сегментаційний спороутворенні відразу після утворення проспори починається формування поперечних перегородок, що розділяють спороносій на кілька рівномірних клітин - спор. При дозріванні спор, спороносій розпадається на окремі сегменти (спори) [11].

Штам зберігається у вигляді ліофілізованої спорової суспензії при 0-4°C та на щільному середовищі Чапека [6].

Багато штамів продукують один або більше антибіотиків. У складі петідоглікана клітинної стінки велика кількість L-діамінопімелінової кислоти. Не містять міколових кислот, але у великих кількостях містять насичені жирні кислоти ізо- та антеізобудови; основні ізопреноїдні з'єднання - гекса- або октагідріровані менахінони з 9 ізопреновими одиницями. У складі складних полярних ліпідів зазвичай присутні фосфатиділгліцерол, фосфатиділетаноламін, фосфатиділінозитл і фосфатиділінозитолманнозиди [7].

1.6 Поширення в природі

Актиноміцети – це численна та широко поширена група ґрунтових мікроорганізмів, що становить від 10 до 50% ґрунтової мікрофлори [15].

Вони є важливими продуцентами вторинних метаболітів. Отримувані метаболіти різноманітні за своєю біологічною активністю і функцій, таких як протигрибкова, інсектицидна, антибактеріальна і антигельмінтна активність. Актиноміцети, як і інші мікроорганізми, що стимулює зростання рослин, також продукують фітогормони й розчиняють фосфат. Це має велике значення для демонстрації інтересу до використання актиноміцетів, які можуть

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		22

розчинити фосфат в ґрунтах з дефіцитом фосфатів. Вони здатні взаємодіють з рослинами як вільно живучі не симбіотичні бактерії [16].

Можна стверджувати, що найбільш вивченого родом актинобактерій є *Streptomyces*, які мають складний розвиток життєвих циклів і виробляють численні вторинні метаболіти, які використовуються в медицині в якості антибактеріальних, протипухлинного і імундепресантів.

Бактерії *Streptomyces* добре пристосовані до життя в ґрунті, де вони ростуть як субстратний міцелій, що складається з безлічі гіф, які ростуть шляхом подовження наконечника і розгалужуються в ґрунті в пошуках поживних речовин [17]. Вони виділяють велику кількість ферментів, які розщеплюють нерозчинні органічні полімери, в тому числі хітин і целюлозу, на цукру-заступники для зв'язування і поглинання кількома переносниками.

Різноманітність вторинних метаболітів, вироблених *Streptomyces* змусили деяких учених стверджувати, що вони не просто використовуються для знищення інших ґрунтових організмів, але є сигнальними молекулами, які в низьких дозах можуть модулювати транскрипцію і трансляцію генів в організмах-мішенях. Хоча концентрації вторинних метаболітів в природному середовищі відомі рідко, представляється можливим, що антибіотичні сполуки зазвичай присутні в субінгібуючих концентраціях [18].

Бактерії *Streptomyces* володіють стійкістю до власних антибіотиків щоб уникнути самознищення, і під виборчим тиском (тобто постійний вплив антибіотиків) ці гени стійкості можуть поширюватися на інші ґрунтові бактерії і патогенні бактерії за допомогою горизонтального перенесення генів. Бактерії *Streptomyces* також стійкі до оксиду азоту (NO), природного антимікробного газу, який виробляється імунною системою людини для знищення вторгаються мікроорганізмів і нітратредуктаза ґрунтових мікроорганізмів [16].

Багато грампозитивні ґрунтові бактерії кодують NO-синтази, включаючи патогенні для рослин *Streptomyces* і було показано, що NO надає стійкості до антибіотиків, припускаючи, що деякі ґрунтові бактерії

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						23
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

продукують NO для боротьби з природними антибіотиками, виробленими іншими ґрунтовими мікроорганізмами.

З'являється все більше свідчень того, що стрептоміцети є не тільки вільно живуть ґрунтовими бактеріями, а й утворюють симбіози з іншими організмами, особливо з рослинами і безхребетними.

У кількох випадках *Streptomyces* утворюють захисні взаємні симбіози, в яких господар живить і захищає бактерії, а натомість бактерії надають антибіотики для захисту господаря або ресурсів господаря від патогенів [19].

В останні роки стало ясно, що стрептоміцети і інші актинобактерії добре пристосовані до життя в симбіозі з безхребетними, де вони в основному грають захисну роль, виробляючи антибіотики, які використовуються для захисту личинок господаря або джерела їжі від інфекцій, що викликаються патогенами. Морські губки належать до числа найстаріших багатоклітинних тварин і стають основним морським джерелом нових вторинних метаболітів, принаймні деякі з яких виробляються бактеріями. Бактерії по-різному служать джерелом їжі для морських губок або збудником хвороб, але актинобактерії і інші бактерії, які продукують антибіотики, пов'язані з морськими губками, також забезпечують захист від хвороб [20,21].

Нещодавно було виявлено, що морські конусні равлики мешкають в різноманітних спільнотах актинобактерії, серед яких багато видів *Streptomyces*. Деякі з виділених штамів актиноміцетів продукували сполуки з неврологічною та/або протигрибковою біологічною активністю [18,20].

Streptomyces показати спосіб життя, починаючи від доброякісних сапрофітів до корисних рослинних ендосимбіонтів і рослинних патогенів. Вони мають конкурентну перевагу перед багатьма іншими мікроорганізмами в ґрунтових екосистемах завдяки їм ниткоподібному способу життя, який дозволяє їм зберігатись в суворих умовах навколишнього середовища. Ниткоподібний спосіб життя стрептоміцетів також дає бактеріям цього роду здатність колонізувати прилеглі коріння і згодом безпосередньо проникати в рослинні клітини для проникнення в господаря [21].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						24
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА

2.1 Характеристика кінцевого продукту

Кінцевим продуктом є комплекс гідролітичних ензимів з провідною протеолітичною та літичною активністю, що синтезується продуцентом *S.albus* 2435/М. У складі ферментного комплексу ідентифіковані специфічні літичні петидази та протеази, мурамілази та гексозамінідази.

Згідно з Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [22], протеази відносяться до 4 групи 3 підгрупи (гідролази) і утворюють підклас пептид-гідролаз, або протеаз. Протеази відносяться до класу ферментів, які відіграють важливу роль у фізіологічних процесах, що обумовлено їх високою активністю щодо різних білкових субстратів. Вони приймають участь у таких біологічних процесів, як зсідання крові, контроль смерті клітини, диференціація тканин. Протеази здатні каталізувати ряд процесів при пухлинних захворюваннях та під час інфекцій, які викликані мікроорганізмами і вірусами. Це робить ферменти потенційною мішенню для створення нових фармацевтичних продуктів.

До особливостей протеолітичних ферментів мікробного походження відносять малу кількість залишків сірковмісних амінокислот і, внаслідок цього, невелику кількість або навіть повну відсутність дисульфідних зв'язків в їх молекулах. Зовсім немає дисульфідних зв'язків у складі таких ферментів, як лужна та нейтральна протеаза [23].

Низький вміст дисульфідних зв'язків є спільною рисою екзоферментів бактеріального та грибного походження (амілази, протеази тощо).

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ВИРОБНИЦТВА	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб		Скобєлева С.Р.				Д	25	120
Консультант						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тодосіючик Т.С.						
Затверд.								

Припускається, що відсутність дисульфідних зв'язків в екзоферментах пов'язана з механізмом їх вивільнення з живої мікробної клітини.

У зв'язку з низьким вмістом дисульфідних зв'язків найбільше значення у підтримці третинної структури мають нековалентні зв'язки, які утворені неполярними (гідрофобними) боковими ланцюгами амінокислотних залишків. Підтвердження важливої ролі гідрофобних взаємодій у підтримці третинної структури субтилізину було отримано за допомогою рентгеноструктурного аналізу, який показав, що ядро молекули ферменту складається з щільно упакованих гідрофобних ланцюгів амінокислот.

Однією з особливостей мікробних протеаз є також стабілізуюча дія на фермент деяких іонів металів, особливо кальцію.

Найбільш важливою функцією екстрацелюлярних протеаз є гідроліз білків та інших високомолекулярних субстратів, які містяться в навколишньому середовищі, та перетворення їх у форму, що здатна легко проникати всередину клітини. Тому більшість відомих протеаз мікроорганізмів функціонують як позаклітинні ферменти. Важливе значення екзопроtease в забезпеченні клітин мікроорганізмів низькомолекулярними продуктами розщеплення білка знаходить підтвердження в багатьох експериментальних даних [24].

Важливе місце займають актиноміцети *Streptomyces*, які синтезують кислі, нейтральні і лужні протеази, що активні в діапазоні рН від 3 до 11, проявляють широку субстратну специфічність, але мають нижчі реакційні швидкості і менш термостабільні, ніж бактеріальні [25-27].

Класифікація протеаз здійснюється за трьома критеріями:

- 1) тип каталітичної реакції;
- 2) хімічна природа каталітичного сайту;
- 3) зміни структури молекули в результаті еволюції.

Протеази по сайту розщеплення ділять на дві групи: ендопептидази та екзопептидази. Ендопептидази можуть відщеплювати кінцеві амінокислоти, але не здатні гідролізувати пептидні зв'язки, що знаходяться в середині

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		26

ланцюга. В залежності від кінця пептида, який піддається гідролізу, їх розділять на: N-кінцеві амінопептидази та С-кінцеві карбоксипептидази. Ендопептидази розщеплюють пептидний зв'язок всередині пептидного ланцюга. Вони «впізнають» та зв'язують короткі пептидні послідовності субстратів та відносно специфічно гідролізують зв'язки між певними амінокислотними залишками.

Інший спосіб класифікувати протеази – за механізмом дії. Протеази відрізняються за будовою функціональної групи каталітичного центру та послідовностей амінокислот, що входять у склад ферменту. Розрізняють 4 групи протеаз: серинові (рисунок 2.1), аспарагінові, цистеїнові (рисунок 2.2) і металопротеази [28].

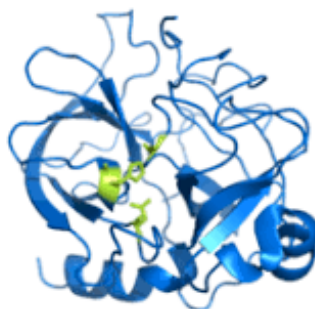


Рисунок 2.1 – Структура серинові протеази *S.albus*



Рисунок 2.2 – Структура цистеїнової протеази *S.albus*

Важливою характеристикою ензимів, в тому числі і протеаз, є їх субстратна специфічність. Встановлено, що деякі ензими проявляє високу специфічність тільки до колагену. Це може бути обумовлено спорідненістю протеази до амінокислотних залишків Gly і/або Pro, які переважають в

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		27

структурі молекули колагену. Більш низьку до легкорозчинних субстратів – казеїну, желатину і альбуміну.

Відомо, що колагенази мікробного походження застосовують для створення фармацевтичних композицій для загоєння та очищення раньових, опікових та інших пошкоджень шкіри. Колагеназні протеази поділяються на дві основні групи: металоколагенази та серинові колагенази. Серед бактеріальних продуцентів металопротеази є найбільш розповсюдженими, в той час як серинові та інші протеази рідко зустрічаються [29].

2.2 Основні хімічні перетворення процесу

Для проведення виробничого біосинтезу культурою *S. albus* 2435/М було обране середовище базове середовище (рН = 7,8—8,2) наступного складу (г/л): м'яса – 6,0; соєве борошно дезодороване – 8,0; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 5,8; NaCl – 14,0; $CaCl_2$ – 4,5.

Основним компонентом поживного середовища є м'яса, яка має не постійний хімічний склад та містить азотисті сполуки, переважно амід, вуглеводи, зола (мінеральні речовини) та мікроелементи.

В процесі росту культура споживає глюкозу в якості основного джерела вуглецю. Процес розщеплення цукрів до піровиноградної кислоти (ХІ) по схемі Ембдена-Мейергофа-Парнаса (Додаток А) [30].

Далі піровиноградна кислота за рахунок циклу Кребса перетворюється в щавлевооцтову кислоту (Додаток Б). В умовах достатнього надходження кисню піровиноградна кислота перетворюється в ацетил-кофермент А (Co-A). Він виступає в якості основного субстрату для серії реакцій, відомих як цикл Кребса, або дихальний цикл, цикл трикарбонових кислот. Щавлевооцтова кислота, що утворилась, з'єднується з аміаком, утворюється аспарагінова кислота, яка являє основу білкової структури [31].

В натуральних середовищах невизначеного складу, що містять кукурудзяний екстракт, соєве борошно та інші подібні компоненти, азот

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		28

головним чином міститься у формі білків, поживна цінність останніх залежить від наявності відповідних протеаз у мікроорганізмів, які здатні розщеплювати ці білки, і визначається тим наскільки легко процесі ферментативного гідролізу з білків звільняється азот у вигляді амінокислот і нескладних поліпептидів, а в кінцевому рахунку в формі NH_2 . Багато організмів здатні більш легко засвоювати форми азоту такі як амонійні солі та амінокислоти, в яких азот знаходиться у відновленій формі.

Амінокислоти грають істотну роль в метаболізмі мікроорганізмів. Це пояснюється тим, що: по-перше, амінокислоти приймають участь в синтезі білка (структурного і ферментів) і різних поліпептидів; по-друге, вони можуть брати участь в утворенні антибіотиків, в тому числі і небілкової природи. Присутність в середовищі одних амінокислот може призводити до утворення інших. Велика кількість мікроорганізмів здатні використовувати і окислені форми азоту, деякі з них для біосинтезу антибіотика потребують саме в нітратного джерелі. Цілком ймовірно, процес використання нітратів йде через наступні етапи:



Процес відновлення нітрату до нітриту йде за участю молібденвмісного ферменту нітратредуктази. Процес перетворення NO_3 в NH_3 відбувається через утворення азотноватистої кислоти ($\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$), гідроксламіну (NH_2OH) та гідрозина (NH_3).

Актиноміцети краще засвоюють нітрати як джерело азоту, у порівнянні з амонійними солями. Нітрити, що були внесені до складу поживного середовища, також можуть використовуватись в якості азотного живлення актиноміцетами. Важливо відзначити, що використання нітритів тісно пов'язане з джерелом вуглецю середовищі.

Вуглецеві скелети амінокислот утворюються з проміжних продуктів обміну. Аміногрупи вводяться шляхом прямого амінування або трансамінування. Переклад неорганічного азоту в органічні сполуки відбувається завжди через аміак. Нітрати, нітрити та молекулярний азот

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		29

попередньо відновлюються до аміаку і тільки після цього включаються до складу органічних сполук (рисунок 2.3, а, б, в). Лише деякі з амінокислот утворюються в результаті прямого амінування вільними іонами NH_4 . У первинної асиміляції - аміаку беруть участь L-глутаматдегідрогеназа (рисунок 2.3, е) і L-аланіндегідрогеназа (ж), які здійснюють відновне амінування 2-оксокислот. Утворення глутаміну з глутамату каталізується глутамінсінтетазою (г). Цей фермент має у багато разів більшу спорідненість до іонів амонію ніж названі дегідрогенази, і тому активний навіть при вкрай низьких концентраціях NH_4 ; для утворення глутаміну необхідний АТР. За допомогою глутаматсінтази (д) амідна група глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат [32].

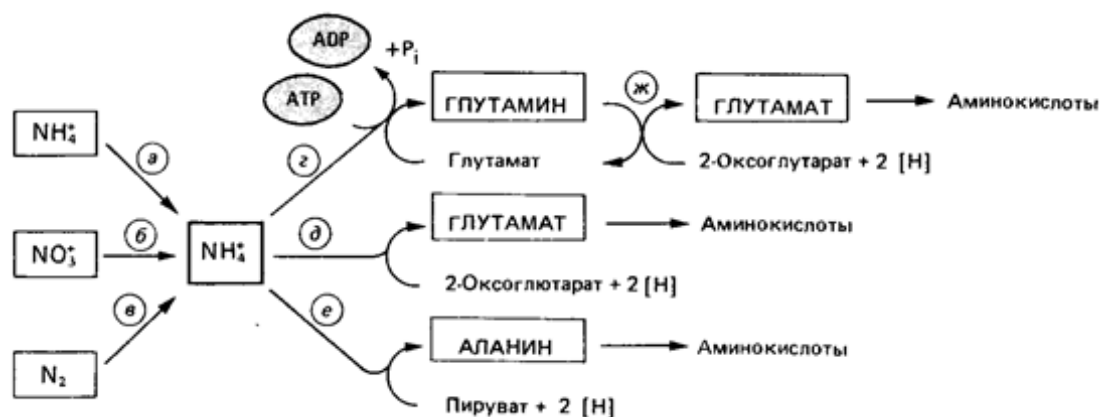


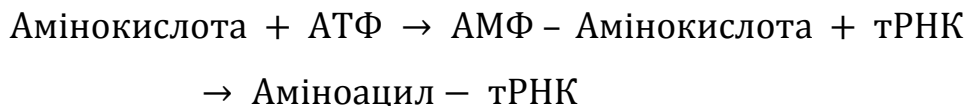
Рисунок 2.3 - Найважливіші шляхи асиміляції азоту

Іони амонію, що містяться в живильному середовищі, безпосередньо поглинаються клітинами (а). Іони нітрату при асиміляційній нітратредукції (б), а молекулярний азот (N_2) при фіксації азоту (в) відновлюються до іонів амонію. В органічні сполуки амонійний азот перекладається або за участю АТР шляхом утворення глутаміну, або без витрати АТР шляхом прямого відновного амінірування 2-оксоглутарат або піруват

Вихідним матеріалом для синтезу амінокислот служать прості проміжні продукти обміну (піруват, 2-оксоглутарат, оксалоацетат або фумарат). При синтезі більшості амінокислот аміногрупа вводиться тільки на останньому етапі шляхом трансамінування. Деякі амінокислоти утворюються в результаті

ряду перетворень інших амінокислот, і в цих випадках трансамінування не потрібно. Амінокислоти можна поділити на групи, виходячи із шляхів їх синтезу (Додаток В) [33].

Загальна схема активації амінокислот:

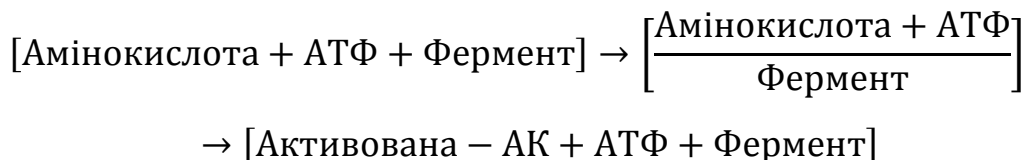


Головну роль на цьому етапі біосинтезу відіграють транспортні РНК (тРНК), які приєднують для транспортування до рибосом 20 основних амінокислот. Тому виділяють стільки тРНК, скільки видів амінокислот. Оскільки багато амінокислот кодуються декількома триплетами, кількість різновидів тРНК зі своїми антикодонами більша за 20 (їх відомо близько 60). Молекули тРНК мають структуру, подібну до листочка конюшини. У молекулі тРНК є чотири важливі ділянки: 1) антикодон (триплет, який відповідає коду даної амінокислоти в молекулі ІРНК); 2) акцепторна ділянка (однакова у всіх тРНК (ЦЦА) і є місцем прикріплення відповідної амінокислоти); 3) ділянка, що кодує відповідну амінокислоту; 4) ділянка, що служить для регуляції орієнтації та руху аміноацил-тРНК до місця синтезу білка.

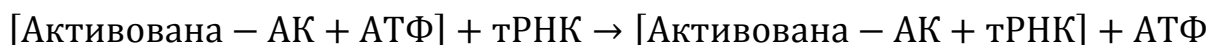
Подалі процес синтезу білкових речовини поділяють на чотири стадії:

I - активація амінокислоти. Відбувається даний процес в цитоплазмі. Амінокислота з'єднується з АТФ-сполукою, яка несе енергію, при допомозі ферменту.

Активована амінокислота має здатність в подальшому зв'язуватись з іншими амінокислотами.



II – стадія зв'язування активованої амінокислоти з транспортною тРНК, в результаті чого утворюється сполука з великою енергією, яка в подалі використовується для утворення пептидних зв'язків.



					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		31

Отримана сполука транспортується через цитоплазму до рибосом.

III – стадія. Синтез поліпептидних ланцюгів. Сполука [Активована – АК + тРНК] до іРНК, яка знаходиться на рибосомі, та з'єднується з нею в чіткому значення місці кінцем вільним від амінокислоти. Нуклеотиди іРНК вступають у комплементарний зв'язок з нуклеотидами тРНК. Молекула амінокислоти принесена тРНК ніби «повисає» біля іРНК в певному місці, після чого молекула тРНК знову повертається в протоплазму, а ділянку іРНК разом із амінокислотою виходить із рибосоми, в яку попадає нова ділянка іРНК. Так поступово протягується уся іРНК.

Амінокислоті, які виявило на іРНК поруч, з'єднуються між собою пептидними зв'язками, утворюючи ланцюг білкової молекули.

IV - стадія. Утворення трьохвимірної структури білкової молекулами [34].

2.3 Характеристика компонентного складу біотехнологічного препарату, отриманого в процесі реалізації технології

Кінцевим продуктом при реалізації технології, що проектується, є препарат ензигібіотиків (літичних та протеолітичних ензимів), що синтезується продуцентом *S. albus 2435/M*, отримується у іммобілізованій готовій формі для застосування в косметології.

Компонентний склад препарату включає в собі (таблиця 2.1):

- 1) Основну речовину - комплекс гідролітичних ензимів з провідною протеолітичною та літичною активністю.
- 2) Домішки, які може містити поживне середовище при біосинтезі.
- 3) Домішки, які утворюються в процесі хімічних перетворень в процесі біосинтезу, а саме – вторинні метаболіти під час катаболізму.
- 4) Носій – аеросил, який зв'язується з ферментним комплексом в процесі іммобілізації.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		32

Таблиця 2.1 – Характеристика компонентного складу препарату

Компонент	Склад компоненту	Вміст компоненті в
Комплекс гідролітичних ензимів	Специфічні літичні пептидази та протеази, мурамідази та гексозамінідази	80%
Домішки з поживного середовища	Меляса (K_2O , MgO , CaO); соєве борошно дезодороване; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; $NaCl$; $CaCl_2$; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10%
Вторинні метаболіти	Піруват, 2-оксоглутарат, оксалоацетат або фумарат	5%
Носій	SiO_2	5%

Вибір аеросилу як носія для адсорбційної іммобілізації обумовлення його високою сорбційною здатністю, завдяки чому його застосовують для виведення з організму бактеріальних токсинів, продуктів часткового розкладу білків та інших речовин. Здатність аеросилу зв'язувати мікроорганізми пов'язана зі спорідненістю частинок кремнезему до глікопротеїдних та фосфоліпідних структур мембран мікробних клітин. Така взаємодія призводить до аглютинації клітин та підвищення їх чутливості до протимікробних препаратів [35].

Перевага аеросилу як носія для створення готової форми іммобілізованого препарату зумовлена утворенням ним додатково водневих зв'язків із силанольними групами та багатьма ОН-групами поверхні кремнезему, за участю, очевидно, й залишків зв'язаної з ферментом води. Це визначає загалом вищу міцність іммобілізації ферменту на аеросилі та можливість використання вказаного носія при розробці технології препарату [36].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		33

На поверхні аеросилу містяться активні групи, які зв'язуються за допомогою міжмолекулярних зв'язків з молекулами ферменту за схемою (рисунок 2.4):

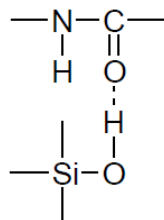


Рисунок 2.4 – Схема міжмолекулярних зв'язків аеросилу та ферментів

Крім цього, механізми взаємодії аеросилу з ферментом є різноманітнішими, а наявність великої кількості гідроксильних груп на його поверхні (завдяки високій абсорбуючій здатності) обумовлює утворення більшої кількості водневих зв'язків (рисунок 2.5):

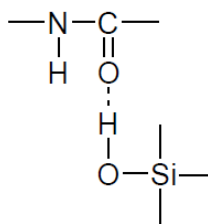


Рисунок 2.5 – Схема міжмолекулярних зв'язків аеросилу та ферментів

Параметри процесу іммобілізації ферментного комплексу з культурального фугату, можна встановити такими: температура 28-32°C, концентрація аеросилу 5% при тривалості процесу 30-45 хв.

Такі параметри є досить оптимальними, оскільки значення літичної активності максимальні (приблизно 7,8 тис. МО/см³).

Отже, для іммобілізації бактеріолітичного ферментного комплексу використовують – аеросил марки А-300 (ГОСТ 14922). Вибір такого носія пов'язаний з його дуже добре розвиненою пористою структурою і площею поверхні, а також високою механічною міцністю і термічною стабільністю.

Розмір частинок варіюється від 70 до 150 мкм в залежності від типу, а розмір пор досягає 250 нм [37].

Отриманий препарат, що синтезується продуцентом *S. albus 2435/M*, отримується у іммобілізованій готовій формі для застосування в косметології, тому він повинен бути стерильним. Стерильні препарати повинні бути отримані з застосуванням матеріалів і методів, що виключають можливість мікробного забруднення, зростання мікроорганізмів і забезпечують їх стерильність.

2.4 Методи очистки цільового продукту

Завершальною стадією біотехнологічного процесу є в ділення цільового продукту. Таким продуктом може бути клітинна біомаса, накопичений продукт і клітинні або він виділяється в культуральну рідину. Найбільш складно виділяти внутрішньоклітинний продукт, оскільки спочатку потрібно відокремити клітини від середовища культивування, піддати руйнуванню, очистити отриманий цільовий продукт від залишків зруйнованих клітин.

В залежності від природи цільового продукту розрізняється технологія виділення та очищення. У деяких випадках існує можливість використовувати продукт у неочищеному стані, оскільки він володіє необхідними властивостями у порівнянні з ретельно очищеним та при умові, що домішки сторонніх речовин не будуть мати негативний вплив при його використанні. Деякі традиційні біотехнологічні процеси взагалі виключають етап відділення продукту [38].

Оскільки, кінцевим продуктом є комплекс гідролітичних ензимів з провідною протеолітичною та літичною активністю, що синтезується продуцентом *S. albus 2435/M*, були запропоновані наступні етапи:

В процесі очищення цільового продукту першим етапи є поділ культуральної рідини і клітинної біомаси. На цьому етапі віддаляють біомасу від фугату, яка надалі йде на знешкодження, а фугат на наступний

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		35

технологічний процес. Для цього застосовуються різні методи сепарації: відстоювання, фільтрація, флотування, сепарування (механічні способи); випарювання і сушка (фізичні способи).

Флотація. Даний метод застосовують для видалення клітин, що володіють низькою змочуваністю, з поверхневих шарів у флотаторі. Такі апарати мають різну конструкцію для видалення піни, що утворилась при культивуванні, разом з прилиплими до бульбашок газу клітинами. Найчастіше використовують для виділення дріжджових клітин.

Фільтрація. В даний час застосовуються різні фільтруючі системи: стрічкові, барабанні, вакуум-фільтри, мембранні фільтри фільтри-преси, тарілчасті фільтри тощо. Принцип таких фільтрів полягає у затримці частинок біомаси на пористій фільтрувальній перегородці. Недоліком такого процесу є налипання часточок на фільтрі, це призводить до зниження швидкості потоку рідини в процесі фільтрування.

Сепарування. Метод заснований на дії відцентрових сил на клітини у сепараторі, при цьому культуральна рідина залишається в апараті, а клітини відкидаються клітини до периферії судини. Такий процес здійснюється набагато, ніж відстоювання клітин під дією сили тяжіння [38,39].

В даній технології біомасу виддаляють сепарацією. Одним із методів сепарації є центрифугування. Такий спосіб є технологічно складним, тому потребує дорожчого устаткування. Його застосовують у випадках, коли:

- фільтрування суспензії здійснюється дуже повільно;
- існує необхідність максимального звільнення культуральної рідини від частинок;
- потрібно забезпечити безперервний процес сепарації.

Другий етап – відділення ферментного комплексу. Виділення цільового продукту з фугату здійснюється шляхом осадження, екстракції або різних методів адсорбції [39]:

- 1) Осадження використовують для перетворення розчиненої речовини у малорозчинний стан. Процес здійснюється при хімічних впливах

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		36

або фізичних (нагрівання чи охолодження розчину, розведення або концентрування).

2) Екстракція використовує властивість розчинності для перенесення розчиненої речовини з однієї фази в іншу фазу. Для проведення екстракції розчинена речовина повинна мати більш високу розчинність в другій фазі, ніж в початковій фазі.

3) Адсорбція – це поверхневий процес, який призводить до переносу молекули з об'єму рідини на тверду поверхню. Це може статися через фізичних сил або хімічних зв'язків.

Адсорбційний матеріал повинен характеризуватися максимальною площею поверхні і мінімальним обсягом. Ефективність адсорбційних процесів залежить від хімічних і фізичних властивостей розчинених речовині твердого поверхні. В процесі адсорбції може бути використаний ряд матеріалів: типові адсорбційні матеріали включають активоване вугілля, цеоліти, поглиначі, активоване оксид алюмінію, лігнітовий кокс і бентоніт [40].

В даній технології безпосереднє виділення цільового продукту проводять методом адсорбційної іммобілізації ферментів. Іммобілізація ферментного комплексу полягає у прикріплення його до нерозчинної основи (носія) або включення у напівпроникну мембрану систему. Іммобілізація ферментів буває фізична та хімічна. Фізична іммобілізація - це процес зв'язування ферментного комплексу без участі ковалентних зв'язків. Існує два типи такого зв'язування: механічний та адсорбційний.

Перший тип іммобілізації відбувається за участі включення ферменту у вигляді мембран, волокон або мікрокапсул в гелі, останній зшит поперечними зв'язками. Другий тип – адсорбційний полягає в утриманні фермента на поверхні носія за рахунок гідрофобних, електростатичних, водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. Фізичні методи іммобілізації часто використовуються і інженерній ензимології, оскільки є досить простими, швидкими, а головне – ефективними.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		37

Відоми чотири фізичних типи зв'язування ферментів (рисунок 2.6): адсорбція на нерозчинних носіях (а); включення в пори гелю (б); відділення ферменту від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани (в); використання системи двофазного типу, де фермент розчиняється і перебуває тільки в одній фазі (г).

Адсорбція ферментів на нерозчинних носіях (рисунок 2.6, а) є дуже простим методом широкого застосування і здатним до високого завантаження ферменту. Просте змішування ферменту з відповідним адсорбентом при відповідних умовах рН і іонної сили з подальшим, після достатнього інкубаційного періоду, вимиванням вільно пов'язаного і незв'язаного ферменту, дасть іммобілізований фермент в формі, придатній для безпосереднього використання.

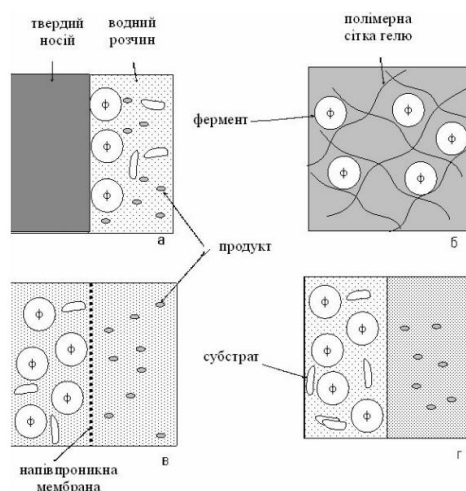


Рисунок 2.6 – Фізичні методи іммобілізації ферментів: а – адсорбція на нерозчинному носії; б – включення в пори гелю; в – відокремлення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани; г – використання системи двофазного типу

Адсорбція використовує фізичні взаємодії, що генеруються між носієм і ферментом, які включають сили Ван-дер-Ваальса, іонні взаємодії і водневі зв'язку. Зв'язування досить слабе та, зазвичай, не змінює нативну структуру ферменту. Це запобігає порушення активних сайтів ферменту і дозволяє ферменту зберігати свою активність. Крім цього для адсорбції ферменту

можна застосовувати будь-який носій, але не кожен фермент може бути іммобілізований на всіх носіях.

Недолік цього методу є низька стабільність іммобілізованих ферментів, що може призвести до швидкого вимивання ферменту з носія. Десорбцію ферменту може викликати також і субстрат. Ці недоліки помітно зменшують використання адсорбції для іммобілізації ферментів.

Головною перевагою – є простота та легке використання методу, його невелика ціна, рівномірний розподіл ферментного комплексу відносно носія та високий вихід продукту [41].

Головними параметрами методу іммобілізації ферментів, які впливають на ефективність процесу є: рН, температуру, концентрацію носія та тривалість контакту [40,41]. Оскільки в ході виробництва іммобілізованого препарату використовується фугат, який має багатокомпонентний склад, його значення рН контролювати недоцільно. Технологічний режим процесу під час іммобілізації ферментного комплексу було обрано наступним: температура 28-32°C, концентрація аеросилу 5% при тривалості процесу 30-45 хв.

Перспективи використання адсорбційних методів для виділення ферментних препаратів, у порівнянні з іншими методами, зумовлені можливістю обробки великих об'ємів розчинів при відносно простому апаратурному оформленні та скорочених термінах, зниженням енергоємності процесу та втрат активності при концентруванні ферментів, можливістю одночасно з концентруванням здійснювати очищення від баластних домішок. Очевидно, що у багатьох випадках адсорбційні процеси можуть розглядатися як ефективні та економічні методи отримання іммобілізованого продукту в технології ферментних препаратів [42].

2.5 Механізм впливу цільового продукту на біохімічні процеси

Цільовим продуктом є препарат ензиміотиків (літичних та протеолітичних ензимів), що синтезується продуцентом *S. albus* 2435/M,

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		39

отримується у іммобілізованій готовій формі та використовується в косметології.

Практичне застосування ензигіотиків визначається широким антимікробним спектром щодо всіх типів мікробних клітин та одночасний вміст бактеріолізинів, антибіотику у складі продукту обумовлює комплексну антисептичну дію препарату не лише щодо руйнування, а й пригнічення подальшого розвитку патогенів.

Літичні ферменти розчиняють клітини стінки патогенних мікроорганізмів за рахунок розчеплення полісахаридних компонентів, які містять в ній. Функція клітинних стінок мікроорганізмів – захист механічної міцності. Бактерія, яка не має клітиної стінки, зазвичай лопається через високий осмотичний тиск всередині клітини. Клітині стінки бактерій містить велику кількість полісахаридів, який містить два типи цукрів: N-ацетилглюкозамін та N-ацетилмурамову кислоту [43].

Літичні ферменти каталізують розщеплення 1,4- β -зв'язку між N-ацетилмурамовою кислоти і N-ацетилглюкозамін, отже, центром його атаки може бути кожна друга O-глікозіліний зв'язок мукоплісахаридах та мукопептидах. При цьому гідроліз протікає таким чином, що N-ацетилмурамовая кислота завжди залишається у відновлюючого кінця розщеплених фрагментів. Інші бактеріолітичні ферменти – ендонацетилглюкозамінідази також каталізують розщеплення 1,4- β -зв'язку, але між залишками N-ацетилмурамовою кислоти і N-ацетилглюкозамін. При цьому у відновленого кінці розщеплених фрагментів завжди залишається N-ацетилглюкозамін.

Крім глікозидаз, глибоку деградацію надає дія бактеріолітичних пептидаз і амідаз. Специфічні пептидаза спочатку руйнують міжпептидні містки, що зв'язують пептидоглікани з утворенням трьохмірної структури, а також розщеплення тетрапептидних замісників біля залишків ацетилмурамової кислоти. Амідази головним чином розривають зв'язку між N-

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		40

ацетилмурамлільними залишками та залишкам L-амінокислот у тетрапептидних замісниках [44].

Велика кількість різних ендопептидаз та карбоксипептидаз бактеріального походження, здатні розщеплювати глікопептиди клітинної стінки, але про механізм їх дії мало відомостей.

Використання ферментів в косметичній галузі надає можливості для створення засобів лікувально-профілактичного напрямку, які не мають побічної дії (подразнення, алергії, токсикози). Ферменти ефективні в складі очищаючих кремів і масок, оскільки прискорює процес гідролізу старого колагену в шкірі, не ушкоджуючи новий, завдяки чому епідерміс має можливість синтезувати новий колаген незалежно від віку шкіри. Протеолітичні ферменти протидіють процесам старіння, які спричиняються мутаціями. Плазматична мембрана та цитоплазма здорових клітин містить достатню кількість інгібіторів для захисту від ендогенних протеаз, присутність яких була в багатьох випадках показана на культурі клітин [45].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		41

РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ

3.1 Генетична вивченість біологічного об'єкту

3.1.1 Наявність генетичних карт продуценту або типового представника групи

Послідовність геному виявила, що *Streptomyces sp.* можуть виділяти приблизно до 10% своїх геномів для біосинтезу біоактивних вторинних метаболітів. Однак більшість цих біосинтетичних генних кластерів виражені лише слабо або зовсім відсутні.

Штам *Streptomyces albus J1074* - один з найбільш широко використовуваних для гетерологічного виробництва біоактивних природних продуктів. Швидкий ріст і ефективна генетична система роблять цей штам привабливою моделлю для вираження криптичних біосинтетичних шляхів для сприяння виявленню наркотиків. *S. albus J1074* широко використовуваний для експресії кластерів генів вторинних метаболітів.

Біоінформативний аналіз геному цього організму передбачає наявність 27 генних кластерів для вторинних метаболітів. У дослідженнях [] було використано три різні стратегії для активації деяких цих криптичних генних кластерів у *S. albus J1074*: два гібридні полікетид-не-рибосомальні пептиди (PK-NRP) (антиміцин та 6-епі-альтераміди), тип I ПК (кандицидин), не-рибосомні пептиди (NRP) (індігоїдин) та глікозильовані сполуки (пауломіцини) [46].

					ДП 6215 00 000 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ		
Розроб.	Скобелєва С.Р.						
Консультант							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затверд.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	42	120
					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		

Геном *S. albus J1074* містить 6 823 670 bp [73,2% вмісту гуанін-цитозину (GC)]. Ця послідовність включає 5968 генів, що кодують 5902 передбачувані білки. На момент виходу послідовності геному у *S. albus J1074* не повідомлялося про вироблення вторинних метаболітів. Однак *S. albus G*, батьківський штам *S. albus J1074* (Chater and Wilde, 1976), був показаний (після обробки N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном та виділенням мутанта *J1670*) для отримання пауломіцинів А і В та інші штами *S. albus* показали, що виробляють полієфір саліноміцин [47].

Послідовність геномів хромосоми *S. albus J1074* визначались, використовуючи антибіотики для біоінформатичного інструменту та вторинну оболонку аналізу метаболіту та було виявлено 26 вторинних кластерів біосинтезу вторинного метаболіту (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1 – Загальні особливості хромосоми

Характеристика	Значення
Топологія	Лінійна
Загальний розмір	7090956bp
Вміст G+C	73,2%
Кодуючих послідовностей	5968
Середня довжина гену	1011 bp
Кодування, %	76,10 %
pРНК	7
tРНК	65 (43 види)

Генетична карта штаму *S. albus J1074* зображена на рисунку 3.1 [48]:

Image generated by CGView

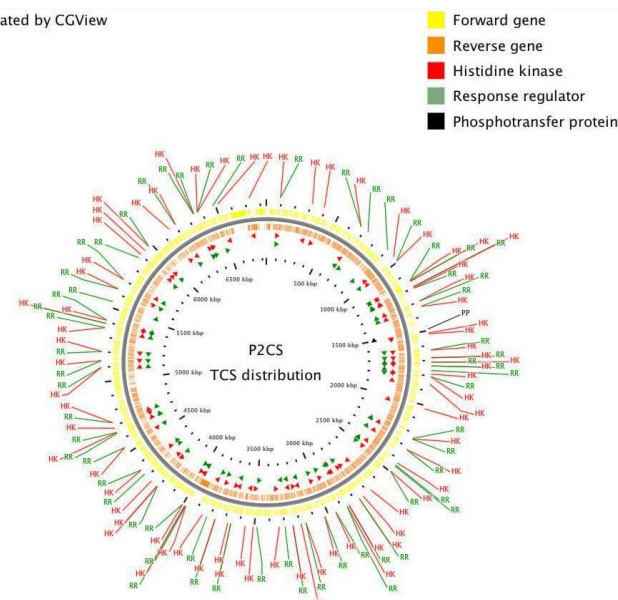


Рисунок 3.1 – Генетична карта штаму *S. albus* J1074

3.1.2 Вивченість механізмів експресії генів, відповідальних за синтез цільового продукту, індукторів та репресорів процесу синтезу

Штам *S. albus* кодує продукцію збереженого набору з 18 вторинних метаболітів. Вісім цих метаболітів виробляються більшістю (якщо не всіма) стрептоміцетами і включають: десферріоксамін та аеробактиноподібні сидерофори, осмоліти ектоїну, компоненти гопаноїдної мембрани, каротиноїдні пігменти тетрагідроксинапталени, морфологічно важливий лантипептид, SapV та летючі геосміни, функція яких залишається незрозумілою майже через 50 років після її відкриття [49]. Решта 10 генних кластерів, які перебувають у всіх штаммах *S. albus*, не так широко зберігаються на рівні роду [50]. Ці метаболіти включають: кандицидин, полієнову протигрибкову сполуку, інгібітор дихальної ланцюга та антиантиапоптотичний засіб, антиміцин, антибактеріальний препарат, подібний до граміцидину, летючий терпеноїдний антибактеріальний, альбафлавенон та протигрибковий альтерамід.

Крім того, основний вторинний метаболіт *S. albus* включає п'ять невідомих продуктів, кодованих NRPS (2), типу I PKS (1) та бактеріоцином (2), генними кластерами [51].

Крім основного метаболіту, *S. albus* містить 14 «допоміжних» біосинтетичних генних кластерів. Допоміжні біосинтетичні генні кластери зберігаються з різною мірою за допомогою штамів *S. albus*. Генетичні кластери NRPS були найпоширенішим класом біосинтетичної системи (7 із 14 генних кластерів), а за ними гібридні NRPS / PKS системи. Як і слід було очікувати, переважна більшість допоміжних генних кластерів кодує виробництво невідомих продуктів [50].

Штати *S. albus* містять загалом 17 штамово-специфічних генних кластерів, продукти яких передбачають усі основні класи вторинних метаболітів. Кожен штам *S. albus* визначає щонайменше один генний кластер, специфічний для штаму, який відповідає штамам *Salinispora arenicola*, *S. pacific* та *S. tropica*, кожен з яких кодує вироблення ~1,0-специфічного штаму .01 або нерибосомного пептиду. *S. sp.* PVA 94-07 та *S. sp.* GBA 94-10 містить один штам специфічного гена кластера, що є найменшим числом, вказаним із усіх штамів. Однак вісім генних кластерів з невідомими продуктами поділяються між *S. sp.* PVA 94-07 та *S. sp.* GBA 94-10 і не переживають інші штами *S. albus*, що дозволяє припустити, що незважаючи на це, *S. sp.* PVA 94-07 та *S. sp.* GBA 94-10 дають значну кількість нових сполук. *S. sp.* S4 містить шість штамових генних кластерів, продукти яких становлять 21% його вторинного метаболіта, що є більшою частиною будь-якого штаму *S. Albus* [50].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						45
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.2 Загальні методи створення високопродуктивного промислового продуценту

3.2.1 Використання природного та штучного добору для отримання промислових продуцентів (без використання мутагенів та з використанням мутагенів)

Виділення мутантів культури зі зміненою стійкістю до стрептоміцину. Мутанти, стійкі до стрептоміцину, отримували шляхом висіву суспензії спор *S. albus* 2435 на середовище Беннета з різними концентраціями антибіотика. Колонії, що вирости на середовищі з антибіотиком, уколom пересівали на матричні чашки і робили повторну перевірку їх резистентності.

Визначення стабільності ознак резистентності виділених варіантів до антибіотика проводили шляхом висіву спор після їхнього зберігання на косяках з антибіотиками та без них, та наступним пересівом репліками на середовища з відповідною концентрацією антибіотика. Штами, які вирости на середовищі з стрептоміцином після трьох пасажів через неселективні умови вважали стрептоміцин – резистентними мутантами.

3.2.2 Використання індукованого мутагенезу

- Для отримання продуцентів *S. albus* 2435/М використовують хімічний мутагенез (N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину).
- Методика проведення обробки:

Наважку мутагену розчинити у Трисмалейновому буфері (ТМ-буфер) до концентрації 0,1 %. Спорову суспензію *S. albus* 2435 сконцентрувати до 1×10^9 клітин/мл в об'ємі 400 мкл. Суспензію розділити на 4 порції по 100 мкл. В кожен пробірku внести Трисмалейновий буфер та розчин мутагену так, щоб кінцева концентрація НГ в кожній з трьох пробірок становила 1, 2 та 3 мг/мл. Остання пробірka повинa містити тільки розчин спор у буфері. Суспензію спор струсити протягом 20 хв для кращого проникнення мутагену в клітини. Відмити дистильованою водою два рази, виконати десятикратне розведення і

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						46
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

висівати на чашки з вівсяним середовищем. Культивування відбувається протягом 4 діб в термостаті при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ [53].

Порівнюють кількості колоній, утворених спорами, які вижили після обробки мутагеном, з числом колоній, що виникли із необроблених спор, і визначали відсоток виживання.

- Матеріал, що піддається обробці:

Вплив НГ на виживання та мінливість бактеріолітичної здатності штаму *S. albus* 2435 визначали по відношенню до тест-культури *Sarcina lutea*, яка часто використовується в селекції стрептоміцетів та є представником грампозитивних бактерій, щодо яких виявляється максимальна активність продуцента.

- Результати використання мутагенезу:

При найменшому значенні концентрації (1 мг/см^3) виживання культури становило приблизно 43%. При збільшенні концентрації до 2 мг/см^3 відсоток виживання зменшувався досягало 32% та при концентрації рівної 3 мг/см^3 – 22%. Такий результат свідчить про те, що збільшення концентрації НГ має негативний вплив на синтез бактеріолізинів, що приводило до зниження середнього значення індексу літичної активності.

Аналіз впливу НГ на утворення штамів-надсинтетиків бактеріолізинів свідчить про низьку ефективність його застосування в селекції *S. albus* 2435, оскільки діапазон використаних концентрації мутагену практично не може бути розширений. Оскільки, обробка культури НГ в концентрації вище 3 мг/см^3 , недоцільна, а доза мутагену нижче 1 мг/см^3 призведе до виживання культури більше 50%, а отже, малий відсоток появи мутантів загалом.

При обробці культури НГ в концентрації 1 мг/см^3 виникає достатньо високий відсоток нових варіантів (6,9 %), а отже можливість індукувати цільові мутації.

Таку здатність НГ доцільно використовувати при дослідженні мутацій стійкості *S. albus* 2435 до стрептоміцину, як фактору відбору надпродуцентів.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						47
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для отримання надпродуцентів також використовують мутації стійкості *S. albus* 2435 до стрептоміцину. Для цього визначали частоту виникнення спонтанних та НГ-індукованих стрептоміцинрезистентних (Str^r) мутантів.

Дослідження встановили, що підвищення концентрації стрептоміцину призводить до зниження кількості життєздатних спор та навіть летального результату. При цьому частота виникнення Str^r -мутантів в культурі, попередньо обробленої 1 мг/см^3 НГ була вищою. Це значить про те, що при обробці культури НГ літичної активності Str^r -варіантів зросло у порівнянні з вихідною культурою при цьому, що вони виявляють здібність зростати на середовищі з стрептоміцетом [54].

Оскільки, в результаті проведеного методу маємо змогу отримати високопродуктивний продуцент, що буде синтезувати більшу кількість ферменту що відіграє важливу роль в процесі лізису клітин, забезпечуючи умови для прояву активності інших літичних ферментів комплексу – пептидаз, протеїназ [55,56].

3.3 Схема отримання продуцента, що використовується в роботі

Запропонований метод на блок-схемі (рисунок 3.2) для отримання продуцента передбачає підвищення у 1,5 рази синтез бактеріолізину порівняно з батьківським продуцентом.

Штами культури *Streptomyces albus* піддавали хімічному мутагенезу з використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину для отримання промислового продуценту *S. albus* 2435/М. Час обробки становив 20 хв., концентрація хімічного мутагену становить 1 мг/см^3 .

Ця культура зберігалась на агаризованому середовищі Чапека та у вигляді ліофілізованої культури.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						48
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

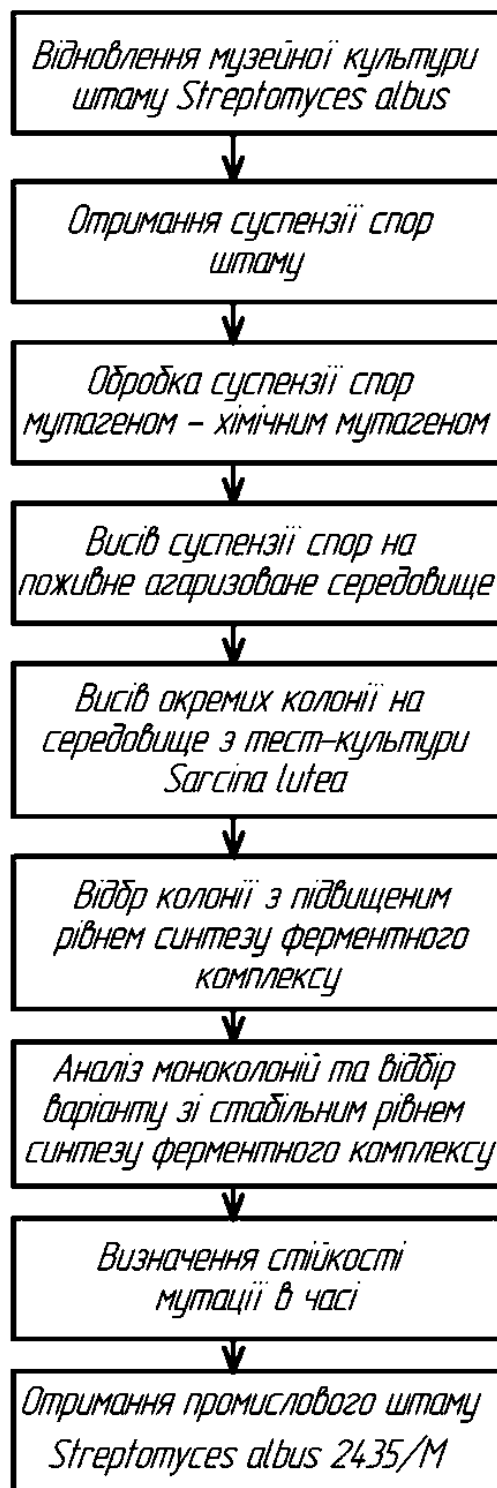


Рисунок 3.2 – Схема отримання продуцента *Streptomyces albus* 2435/M

РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

4.1 Характеристика кінцевої продукції виробництва

Назва продукції: кінцевим продуктом є іммобілізований ферментний комплекс, що синтезується культурою *S.albus 2435/M*.

Діючий нормативно-технологічний документ: продукт виробляється за виробничим регламентом за прототипом діючого іммобілізованого ферментного препарату «Циторецифен-М» (ПР 20.59-02070987-001:2015) [57].

Призначення продукції та галузі використання: препарат призначений для галузевого використання як компонент косметичного засобу, який володіє антисептичними, регенеруючими та протимікробними властивостями. Може використовуватись в основі м'яких препаратів.

Зовнішній вигляд: порошок, фасування по 0,5 кг у поліетиленові пакети та картоні коробки.

Нормативні вимоги до упаковки, маркування, транспортування, зберігання:

Маркування пакувальних матеріалів, нанесене печаткою або тисненням, повинне бути чітким, стійким до дії світла (вигорання) і видалення [58].

Кожна пакувальна одиниця споживчої та групової тари повинна мати етикетку з паперу етикетного (ГОСТ 7625-86) або паперу письмового (ГОСТ 18510-87), виготовлену поліграфічним способом друку (ТУ У 21521832.001) або тисненням із зазначенням наступних позначень:

					ДП 6215 00 000 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА		
Розроб.	Скобелєва С.Р.						
Консультант							
Керівник	Тодосієвичук Т.С.						
Затверд.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					Д	50	120
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського		
					ФБТ		

- товарний знак і назва підприємства-виробника, його адреса і місце виготовлення;

- назва продукту;
- дата виготовлення;
- умови зберігання;
- термін придатності до споживання;
- маса нетто порошку (в г);
- кількість пакувальних одиниць (для групової тари);
- позначення технічних умов.

Транспортують кінцевий продукт в закритих транспортних засобах і контейнерах (ГОСТ 20435) всіма видами транспорту у відповідності з правилами перевезень, що діють на відповідний вид транспорту і додатковими вимогами, вказаними в документі на кінцевий продукт.

Маркування здійснюється із нанесенням маніпуляційного знаку «Оберігати від вологи!» і вищевказаних позначень.

Зберігають препарат у сухих чистих і добре вентильованих складських приміщеннях при температурі не вище +25°C і відносній вологості повітря не більше 75 %.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		51

4.2 Характеристика сировини, матеріалів та напівпродуктів, що використовуються у виробництві

Найменування	Категорія і номер НТД, згідно якої перевіряються показники якості	Показники, що обов'язкові для перевірки та їх нормативне значення	Примітка
1	2	3	4
1. Основна сировина			
Агар харчовий	ГОСТ 16280-2002	Зовнішній вигляд - крупка, гранули, порошок; колір - від світло-кремового до темно-кремового; наявність сторонніх домішок - не допускається	Компонент ПС для відновлення музейної культури
Аеросил А-300	ГОСТ 14922-77	Зовнішній вигляд - пухкий блакитно-білий порошок; масова частка двоокису кремнію на прожарену речовину - не менше 99,9%; рН суспензії - 3,6 -4,3; масова частка вологи - не більше 1,5%.	Наповнювач
Вода дистильована	ГОСТ 6709-72	Масова концентрація залишку після випарювання - не більше 5 мг/дм ³ ; рН води - 5,4-6,6.	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці:

Залізо (II) сірчанокисле 7-водне	ГОСТ 4148-78	Масова частка 7-водного сірчанокислового заліза (II) - не менше 99,8%.	Компонент поживного середовища
Калій хлористий	ГОСТ 4234-77	Масова частка хлористого калія в прожареному препараті - не менше 99,8%.	Компонент поживного середовища
Калій фосфорнокис лий двозаміщени й 3-водний	ГОСТ 2493-75	Масова частка 3-водного двозаміщеного фосфорного калія - не менше 99%.	Компонент поживного середовища
Кальцій хлористий	ГОСТ 450-77	Масова частка хлористого кальцію - не менше 96,5%.	Компонент поживного середовища
Магній сірчанокисли й 7-водний	ГОСТ 4523-77	Масова частка 7-водного сірчанокислового магнія- не менше 99,5%.	Компонент поживного середовища
Марганець (II) хлористий 4- водний	ГОСТ 612-75	Масова частка 4-водного хлористого марганцю (II) - не менше 99,0%.	Компонент поживного середовища

Продовження таблиці:

Меляса бурякова	ДСТУ 3696-98	Зовнішній вигляд - густа в'язка непрозора рідина; колір - від коричневого до темно-бурого; масова частка СР - не менше 75,0%; масова частка сахарози - не менше 43,0%; рН - 6,5-8,5; загальна кількість мезофільних аеробних і факультативно- анаеробних мікроорганізмів, КУО в 1 г - не більше $1,0 \times 10^5$.	Компонент поживного середовища
Натрій азотокислий	ГОСТ 14168- 79	Масова частка натрія азотокислого, у висушеному препараті - не менше 99,8%.	Компонент поживного середовища
Натрій хлористий	ГОСТ 4233-77	Масова частка хлористого натрія в прожареному препараті - не менше 99,9%.	Компонент поживного середовища
2. Допоміжна сировина			
Вода питна	ГОСТ 2874-82	рН 6,0-9,0; хлориди - не більше 350 мг/дм ³ ; жорсткість загальна - не більше 7 моль/дм ³ .	Для мийки і ополіскуван ня обладнання, приготуван ня поживних середовищ

Продовження таблиці:

Засіб миючий синтетичний порошкоподі бний	ГОСТ 25644- 96	Вміст активного хлору 4,86%.	Для мийки обладнання та приміщень
Дезинфікуюч і речовини	ДСТУ EN 1276:2019	Зовнішній вигляд - гранульований порошок від білого до світло-жовтого кольору; миюча здатність - не менше 85%.	Для мийки обладнання та приміщень
Промивна вода	ДСТУ 7525:2014	Мікробіологічна чистота: КУО - 100 см ³ ; індекс БГПК - 3 КУО/дм ³ ; індекс ФК - -; відсутні патогенних мікроорганізми; коліфати; сульфіторедуквальні кlostридії; синьогнійна паличка; мікроміцети.Радіаційна безпека: $\Sigma\alpha$ -активність - 0,1 Бк/дм ³ ; $\Sigma\beta$ -активність - 0,1 Бк/дм ³ . Органолептичні показники, хімічні, токсикологічні	

Продовження таблиці:

3. Матеріали			
Поліетилоно ві пакети	ДСТУ 7275:2012	Маркування, цілісність.	Пакування готової продукції
Картоні коробки	ГОСТ 12301- 2006	Маркування, цілісність.	Пакування готової продукції

4.3 Опис технологічного процесу

Технологія виробництва ензибіотиків складається із наступних принципових стадій: підготовка посівного матеріалу; виробничий біосинтез; виділення та очистка ферментного комплексу. Докладніше дані процеси представлені у графічній частині дипломної роботи на технологічній схемі виробництва ензибіотиків шляхом мікробного синтезу культурою *Streptomyces albus* 2435/М.

Апаратурне оформлення процесів представлено у графічній частині дипломної роботи на апаратурній схемі виробництва.

ДР 1. Санітарна підготовка виробництва

Санітарна підготовка виробництва спрямована на мінімізацію кількості контамінантів у складі речовин, що приймають участь у виробничому процесі, а саме: в технологічному аераційному повітрі, на поверхні обладнання, яке контактує з поживним середовищем, в поживному середовищі та для забезпечення чистоти на виробничих ділянках, які потребують в асептичних умовах для отримання чистої продукції.

Санітарна підготовка являє собою блок робіт та операцій, призначений для забезпечення регламентованої якості продукту на всіх етапах його

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						56
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

виробництва. Даний етап включає підготовку персоналу й приготування моючих та дезінфікуючих засобів.

Санітарна підготовка виробництва та технологічний процес проводяться відповідно до вимог GMP, ДСанПіН та чинних нормативних актів в галузі фармацевтичної і біотехнологічної промисловості [57].

ДР 1.1. Підготовка персоналу

При влаштуванні на роботу персонал повинен пройти медичних огляд та мати медичну картку, подальші огляди проводяться періодично, у тих випадках, коли це необхідно для роботи або визначення стану здоров'я персоналу.

Співробітники та персонал, які працюють на виробництві, в тому числі які здійснюють очищення, технічне обслуговування або контроль якості продукту; у зонах, де виробляється біологічно діючі речовини та біологічні лікарські препарати, здійснюють їх випробування, повинні проходити навчання та підвищення своїх кваліфікаційних знань згідно специфіки виконуваної роботи та продукції, що випускається. Дотримуватись всіх застережувальних заходів для захисту продукту, персоналу та довкілля. Для кращого збереження безпеки продукт на виробництві особливу увагу приділяють здоров'ю персоналу та працівників. При необхідності для всіх співробітників, які зайняті в технологічному процесі, технічному обслуговуванні, задіяні для проведення випробувань або доглядають за тваринами (в тому числі й інспекції), здійснюють вакцинування відповідними специфічними вакцинами, надалі вони повинні регулярно проходити медичні огляди.

Виробник приймає на роботу відповідну кількість співробітників згідно масштабів виробництва, які мають необхідну кваліфікацію та практичний досвід роботи. Вище керівництво має визначити і забезпечити достатні та належні ресурси (людські, фінансові, матеріальні, технічні засоби та обладнання), для впровадження та утримання системи управління якості та підвищення її показників ефективності. Також, виробник відповідає за

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		57

наявність інструкцій, згідно до яких забезпечується його інформування про стан здоров'я співробітників, який може вплинути на якість продукції.

ДР 1.2. Підготовка дезінфікуючих та миючих розчинів

Головним контролем для дезінфікуючих та миючих засобів є мікробіологічна чистота, тому дані засоби необхідно утримувати в попередньо очищеній тарі або контейнерах та зберігати згідно встановлених термінів (окрім розчинів для стерилізації).

Дезінфікуючі розчини, які призначені для обробки приладів та приміщень, виготовляють відповідно до «Методичних рекомендацій щодо приготування і застосування робочих розчинів мийних, дезінфекційних, мийно-дезінфекційних засобів та антисептиків» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Для обробки обладнання, комунікацій та виробничих приміщень готують наступні розчини: розчин перекису водню та розчин синтетичного порошкоподібного миючого засобу.

ДР 1.2.1. Підготовка розчину перекису водню

Розчин перекису водню готують наступним чином: спочатку у збірнику розводять 33%-вий розчин перекису водню питною та перемішують при частоті обертання 40 об/хв до утворення 6%-го, після цього його зберігають в очищеній тарі згідно термінів зберігання. На даному виробництві 6%-вий розчин перекису водню з'єднують з миючим розчином для обробки обладнання та приміщень.

ДР 1.2.2. Підготовка розчину миючого засобу

Розчин миючого засобу готують у збірнику з перемішуючим пристроєм, визначену кількість порошкоподібного миючого засобу з'єднують з водою при температурі 40-50°C та перемішують при частоті обертання 40 об-хв до повного розчинення. Далі його змішують з 6%-вим розчином перекису водню та використовують для обробки виробничих приміщень та мийки вузлів обладнання.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						58
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 2 Підготовка виробничих приміщень

Підготовка виробничих приміщень – це комплекс заходів, які включають в себе обробку не тільки приміщень, а ще й комунікацій, обладнання за допомогою миючих та дезінфікуючих розчинів та чистою водою для досягнення та підтримання необхідного класу чистоти. Дана підготовка здійснюється відповідно до «Методичних рекомендацій щодо підготовки виробничих приміщень» затверджених Наказом МОЗ України від 14 грудня 2001 р. № 502.

Підготовку виробничих приміщень проводять у спецодязі призначеному для виробничих приміщень того ж класу чистоти. Процес підготовки приміщень включає прибирання, яке ділять на щоденне, щотижнєве, щомісячне, піврічне та річне. Щоденне прибирання проводять після кожної зміни; щотижнєве включає миття стелі, обробку підлоги всієї ділянки дезінфікуючими засобами, дезінфекційну та очищення обробку каналізаційної; генеральне - проводять планові ремонтні та слюсарні роботи.

ДР 3 Підготовка обладнання та комунікацій

Цей блок робіт включає в себе очищення, мийку, обробку дезінфікуючими та миючими засобами обладнання і комунікацій із подальшим ополіскуванням. Підготовку обладнання і комунікацій потрібно проводити до початку або після закінчення технологічної операції, або в кінці зміни.

Очищення обладнання здійснюють щоденно та регламентують відповідними розділами інструкцій з експлуатації обладнання та технологічних інструкцій за встановленими на підприємстві методиками. Обов'язковим критерієм при перевірці обладнання є його герметичність та справність, також проводять стерилізацію обладнання, коли це можливо.

ДР 3.1. Мийка вузлів обладнання

Даний процес починається з відключення обладнання та електроприладів від електричного струму. Далі видаляють механічне

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						59
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

забруднення та пил із зовнішніх та внутрішніх поверхонь обладнання за допомогою вологих серветок, щіток, лопаток або пілососа.

Мийка обладнання розпочинається з промивання миючим засобом та теплою водою (приблизно 45 °C), далі висушують або витирають насухо. Наступний крок – дезінфекція – за допомогою дезінфікуючих розчинів протирають усі поверхні обладнання або витримують в ньому. Після цього обладнання промивають очищеною гарячою водою, здійснюють візуальний контроль повноти відмивання технологічного обладнання від дезінфікуючого розчину. Усі відпрацьовані розчини та промивні води направляють на стадію знешкодження відходів.

ДР 3.2. Дезінфекція обладнання.

Дезінфекцію обладнання проводять щодня та щорічно (іноді 2 рази у рік). Щоденна дезінфекція обладнання включає обробку зовнішніх поверхонь обладнання та комунікацій за допомогою дезінфікуючих розчинів перекису водню 6%-го та чистої питної води. Король якості дезінфекції здійснюють візуально.

При щорічній дезінфекції обладнання повністю заповнюють антисептиком або розчином перекису водню та витримують протягом 1,5-3 годин при температурі 55-65°C. Частини, які можна зняти з обладнання поміщують у той же розчин антисептика або перекису водню та витримують аналогічним чином. Комунікації дезінфікують за допомогою передавлювання розчину антисептика від одного апарату до іншого. Завершуючи етап дезінфекції обладнання потрібно його промити декілька раз питною водою, здійснити контроль якості промивної води. Усі відпрацьовані розчини та промивні води направляють на стадію знешкодження відходів.

ДР 3.3. Стерилізація обладнання

Найкращим методом для стерилізації обладнання є термічний, частіше всього використовують стерилізацію перегрітою парою, яка підводиться до апарату за допомогою надлишкового тиску. Також використовують вологу

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		60

термічну обробку за допомогою води та пари, вона має більший ефект у порівнянні з нагріванням сухого апарату.

Стерилізація апаратури та комунікації починається з їх промивання гарячою водою (приблизно 100 °С), яка надходить з магістрального трубопроводу.

Стерилізація обладнання відбувається за допомогою подачі гострої пари, що має температуру 140 °С, тиск 0,2 МПа та тривалістю обробки 1,5 годин, потім обладнання охолоджують протягом 3,5 годин. Гостра пара поступає у середину апарату, його сорочку та в прилеглі комунікації, вона не утворює шкідливих речовин для виробничого процесу та основних продуктів, в результаті утворюється вторинна водяна пара та конденсат.

ДР 4. Підготовка повітря

ДР 4.1. Підготовка вентиляційного повітря

Одним з головних питань технологічної гігієни є очищення повітря у виробничих приміщень, оскільки воно є потенційним джерелом забруднення. Для досягнення цієї мети як правило використовують фільтри, згідно міжнародний стандарт GMP застосовують багатостадійну фільтрацію при виробництві лікарських засобів.

При підготовці вентиляційного повітря необхідно забезпечити виконання наступних завдань:

- видалення та знищення контамінантів;
- видалити пил та інші частинки;
- стиснення повітря для подолання опору арматури та повітропроводів;
- підтримання температури й вологості.

ДР 4.1.1. Забір повітря

Забір повітря з атмосфери виконується за допомогою повітрозбірника ЗП -35 через трубчасту конструкцій висотою 8-10 м. Труби розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		61

Вологість та температура зовнішнього повітря, кількість пилу та мікроорганізмів в ньому завжди різні, оскільки ці показники можуть змінюватись в залежності від висоти забору повітря, погодних умов та пори року, географічного розташування підприємства.

ДР 4.1.2. Механічна очистка повітря

Метою механічної очистки повітря дозволяє виділити різні аерозольні механічні частинки, контамінанти та попередити абразивне пошкодження компресійної апаратури. Для поставлених задач було прийнято використовувати фільтри попередньої очистки, такі фільтри здатні видаляти частинки розміром більше ніж 5 мкм. Фільтри попередньої очистки встановлюють на всмоктуючій лінії перед вентилятором або компресором. Така очистка здатна позбавити повітря від частинок пилу, вологи та деяких мікроорганізмів. Коефіцієнт проскоку від загальної кількості твердої фази – пилу становить 10%.

ДР 4.1.3. Нагнітання повітря

Нагнітання повітря відбувається під час пропускання повітря крізь вентилятор В-37 під тиском 0,2 МПа.

ДР 4.1.4. Кондиціонування та стабілізація параметрів повітря

Стабілізація фізико-хімічних показників повітря відбувається у нагрівальній колоні, у яку повітря надходить через вентилятор В-43. Показників повітря мають бути не більше 20°C та вологості 40-60%.

Нагрівальна колона містить спеціальні вентиля на місці входу в неї гострої пари та зливу з неї конденсату. Очистка повітря здійснюється на повітряному фільтрі Ф-45, він має діаметр пор фільтруючого матеріалу 1,5 мкм та видаляє усі дрібні частинки пилу та мікроорганізмів, які потрапили в систему після проходження фільтрів попередньої очистки. З фільтру Ф-45 виходить вентиляційне повітря, яке надалі поступає до приміщень.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						62
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ДР 4.2. Підготовка стерильного повітря.

ДР 4.2.1. Забір повітря

Забір повітря з атмосфери виконується за повітрозбірника ЗП-28 за допомогою трубчастих конструкцій висотою 8-10 м. Труби розташовується в місцях з мінімальною запиленістю та загазованістю, аналогічно до ДР 3.1.

ДР 4.2.2. Нагнітання та механічна очистка повітря

Під час проходження повітря під тиском через фільтр попередньої очистки Ф-29, воно звільняється від частинок розміром більше 10 мкм, згідно діаметру пор фільтрувального паперу. Далі за допомогою насоса Н-30 повітря нагнітається під тиском 0,2 МПа.

ДР 4.2.3. Видалення вологи з повітря

Основна задача на цьому етапі – осушення повітря та видалення масляного туману. Нагріте повітря після компресора має значну вологість, але для процесу фільтрування газу недопустимо, оскільки конденсат, що утворюється, здатен сформувати канали, через які можливий «проскок» неочищеного повітря. Тому, для вирішення цієї проблеми використовують теплообмінник – це технічний прилад призначений для теплообміну між двома середовищами з різними температурами. Теплообмінник ТО-31 має трубчастий тип та здатен охолоджувати повітря за допомогою води та температура повітря буде зменшуватись до 40°C й менше градусів, оскільки процес ферментації не передбачає високих температур.

Не охолоджуючи повітря можна здійснювати відбір частини ще гарячого повітря на потреби виробництва (наприклад для сушки продукту, сушки обладнання після його миття та ін).

Частинки вологи краще видаляються з охолодженого повітря у ресивері або теплообміннику.

ДР 4.2.4. Стабілізація термодинамічних показників повітря

Стабілізацію термодинамічних показників повітря та попередження його пульсації використовують ресивери – це місткість, яка призначення для скупчування газу, пари або рідини.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		63

ДР 4.2.5. Очищення повітря на головному фільтрі

Після стабілізації в ресивері РС-32 повітря надходить до загального фільтру типу НЕРА 11 Ф-33. Основне навантаження по видалення контамінантів мікробного походження та механічних часток з діаметром менше 5 мкм припадає на головний фільтр.

ДР 4.2.6. Очищення повітря на індивідуальному фільтрі

Індивідуальні фільтри або фільтри тонкої очистки (фільтри стерилізації) використовуються для уловлювання основної маси біологічних забруднень, що пропустили інші фільтри, та все інші можливі забруднення, які могли потрапити в систему випадково.

На таких фільтрах використовується спеціальний фільтруючий матеріал, тому індивідуальні фільтри забезпечують ступінь очищення від мікроорганізмів та її спор до 99,999%. До таких відносять глибинні фільтри, патронні або фланцеві.

Під час очищення повітря на індивідуальному фільтрі відбувається контроль тиску в системі, його перепади можуть свідчити про наявність механічних часточок або мікробних контамінантів. Після очистки на головному фільтрі типу ФТО-60 Ф-34 стерильне повітря надходить до посівного апарату - інокулятора І-4 та виробничого ферментеру Фв-6 для аерації культури продуценту.

ДР 5. Підготовка поживних середовищ

ДР 5.1. Приготування та стерилізація поживного середовища для посівного матеріалу

Посівний матеріал вирощують спочатку у колбах К-2 на 1000 мл з поживним середовищем, а потім – у інокуляторі І-4. Як поживне середовище використовують рідке поживне середовище Чапека наступного складу, г/л:

- нітрат натрію (NaNO_3) – 2,0;
- фосфат калію двозаміщений (K_2HPO_4) – 1,0;
- сульфат магнію (MgSO_4) – 0,5;
- хлорид калію (KCl) – 0,5;

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						64
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- сульфат заліза (FeSO_4) – 0,1;
- агар-агар - 20,0;
- вода дистильована.

Середовище стерилізують в автоклаві при температурі $121 \pm 1^\circ\text{C}$ та 0,1 МПа надлишкового тиску протягом 20 хвилин.

Далі посівний матеріал вирощують в інокуляторі І-4, готують поживне середовища та стерилізують.

На цьому етапі проводиться контроль мікробіологічної чистоти середовища шляхом висіву проб на чашки Петрі із подальшим інкубуванням у термостаті.

ДР 5.2. Підготовка поживного середовища для виробничого біосинтезу

Для біосинтезу ферментного комплексу використовували базове середовище ($\text{pH} = 7,8\text{—}8,2$) наступного складу (г/л):

- меляса – 6,0;
- соєве борошно дезодороване – 6,0;
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 5,8;
- NaCl – 14,0;
- CaCl_2 – 4,5;
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,04;
- H_2O дист. – до 1 л.

ТП 6. Підготовка посівного матеріалу

Посівний матеріал підлягає ретельному мікробіологічному і біохімічному контролю, оскільки як від його активності і чистоти залежить подальший виробничий цикл.

ТП 6.1. Відновлення музейної культури

Вихідну культуру *S. Albus 2435/М* в стерильних умовах висівають у стерильні пробірки Пр-1 з поживним середовищем та інкубують в термостаті Т-3 при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 120 годин. Після цього оцінюють

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						65
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

культуральні особливості: візуально – форму, розмір, колір поверхні, краї та прозорість колоній, морфологічні та мікроскопічні ознаки продуценту, перевіряють мікробіологічну чистоту.

ТП 6.2 Вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

До пробірки Пр-1 з посівним матеріалом та поживним середовищем вносять рідке поживне середовище Чапека, перемішують для утворення суспензії клітин та переносять у колби Ерленмейера К-2 на 1000 мл, що містять поживне середовище у стерильних умовах. Колби поміщують у термостаті Т-3 на качалки та витримують їх протягом 72 годин при температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ при частоті обертання 220 об/хв.

Контроль мікробіологічної чистоти посівного матеріалу на даному етапі проводять візуально.

ТП 6.3. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі

Колби К-2 з посівним матеріалом після інкубування стерильно переміщують в малий посівний апарат – інокулятор І-4, що містить простерилізоване поживне середовище.

Процес в інокуляторі відбувається при за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$, що забезпечується подачею води технічної гарячої в сорочку апарата, протягом 48 годин. Інокулятор І-4, об'ємом $0,4 \text{ м}^3$ при коефіцієнті заповнення 0,5, оснащений механічним перемішуючим пристроєм – відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 220 об/хв та барботером, що забезпечує значну аерацію технологічним повітрям (1 об'єм повітря на 1 об'єм рідини за хвилину).

ТП 7. Виробничий біосинтез

Посівний матеріал з інокулятора І-4 за допомогою перекачувальної системи переміщують у ферментер Фв-6 у кількості 5% від загального об'єму. Ферментером для виробничого біосинтезу є циліндрична ємність об'ємом $3,2 \text{ м}^3$ при коефіцієнті заповнення 0,6.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		66

Ферментер Фв-6 оснащений механічним перемішуючим пристроєм, що забезпечує необхідні умови проведення біосинтезу та створення потоків масо-та енергообміну.

Культура аерується за допомогою вторинного диспергуючого пристрою барботеру, який розміщується під мішалкою та до якого через штуцер подається очищене технологічне повітря. Виробничий біосинтез протікає при $28 \pm 1^\circ\text{C}$, що забезпечується подачею води технічної гарячої в сорочку апарата, протягом 72 годин.

Після завантаження культури у ферментер Фв-6 вміст апарату перемішують за допомогою мішалки протягом 2 хвилин та відбирають у стерильну ємність певний об'єм культури для досліджень мікробіологічної чистоти. Контроль мікробіологічної чистоти культури проводять шляхом висіву проб на чашки Петрі із подальшим інкубуванням у термостаті.

ТП 8. Відділення біомаси центрифугуванням

Першим етапом в процесі очищення цільового продукту є поділ культуральної рідини і клітинної біомаси - сепарація. Апаратурне виконання цього процесу складається з центрифуги Ц-7, куди надходить біомаса за допомогою дозатора Д-8. Центрифуга Ц-7 містить верхню та нижню кришки у вигляді плоских пластин для розділення рідини, в нижній частині ротора знаходиться засіб подачі вхідної суспензії, а в його верхній частині розташований засіб відведення освітленої рідини [50].

Центрифугування проходить при 10000 об/хв протягом 10 хвилин, після чого важка фаза і осад видаляються у збірник для подальшого знешкодження відходів, так як містять залишки біомаси та культу продуценту. Ферментний комплекс за допомогою насоса Н-9 виводиться через отвір поршня та верхньої кришки по системі герметичних шлангів у трубопровід поступає на наступний процес.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						67
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ТП 9. Адсорбційна іммобілізація ферментного комплексу

Після відділення біомаси, отриманий фугат з'єднується з носієм та відбувається адсорбування ферментного комплексу на частинках носія. В якості носія використовують аеросил марки А-300 з концентрацією 5%. Процес відбувається при температурі 28-32°C та триває від 30 до 45 хвилин.

Процес здійснюють у реакторі для іммобілізації Р-10, в якості носія використовують аеросил А-300. Носій вносять у ферментний комплекс та деякий час інкубують. Іммобілізація здійснюється за рахунок осадження білкових молекул та їх адсорбції на частинах носія.

ТП 10. Відділення іммобілізованого препарату центрифугуванням

Рідкий гель, що утворився після іммобілізації препарату, містить практично весь ферментний комплекс. Для видалення ферментного комплексу запропонований метод – центрифугування. Такий прийом дає змогу сумістити в собі виділення, концентрування та іммобілізацію ферменту, що зумовлює ефективність, технічну простоту та економічність розробки.

Апаратурне виконання цього процесу складається з центрифуги Ц-12, куди надходить іммобілізований препарат. Центрифугування проходить при частоті обертання 6000 об/хв протягом 30 хвилин, після чого отримують іммобілізований ферментний комплекс на аеросилі та відділену рідину направляють на знешкодження, а ферментний комплекс подається на розпилювальну сушарку.

ТП 11. Сушіння препарату на розпилювальній сушарці

Процес відбувається у розпилювальній сушарці С-13. Препарат під постійним рівнем подається шестерним насосом Н-14 на розпилювальний диск і розпорошується їм по всьому перерізу вежі. Температура на вході становить 150°C, на виході - 90°C, триває процес сушіння – 1-2 хвилини.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						68
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Повітря з повітрозбірника ПЗ-15, засмоктуваний вентилятором В-17 з атмосфери крізь повітряний фільтр Ф-16, після грубої і бактеріальної очистки подається в калорифери К-18, де підігрівається парою при тиску 10 атм до 140-160°C і потім спіралеподібно по напрямним надходить прямоточно руху препарату в сушарку С-13.

ПМВ 12. Фасування готового продукту у пакети

Фасування готової форми порошку відбувається на автоматичній лінії за допомогою пакувальної машини Пм-27. Готовий препарат фасують по 0,5 кг з похибкою не більше 1,25% в мішки з поліетиленової плівки по ГОСТ 10354-82, які потім запаюють і упаковують в паперові чотирьохшарові мішки марок НМ, ВМ, ПМ або ВМП за ГОСТ 2226 -88.

На кожен паперовий мішок наклеюють, пришивають або наносять трафаретом етикетку, що містить дані про упаковану продукцію:

- найменування підприємства-виробника та його товарний знак;
- найменування препарату;
- марка препарату;
- маса нетто;
- номер партії;
- дата виготовлення;
- призначення препарату;
- норма вводу;
- термін зберігання;
- умови зберігання;
- позначення діючого стандарту.

Продукт упаковують і маркірують відповідно до вимог ГОСТ 28471 «Продукция микробиологическая. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение».

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		69

ЗВ 13. Знешкодження відходів та промислових викидів

В процесі виробництва утворюється відходів, які проходять стадії знезараження.

Миючі та дезінфікуючі розчини, які залишились від ДР1.2 та відпрацьована вода поступають на нейтралізацію стічних вод у збірник, де їх розводять водою декілька раз, потім встановлюють рН за допомогою розчинів соляної кислоти чи їдкого натру на рівні 7,0 та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Залишки посівного матеріалу з посівного апарату та культуральної рідини з ферментеру піддають термічній обробці «гострою парою») $t = 130^{\circ}\text{C}$, за тиску 0,2 МПа продовж 40 хвилин з подальшим охолодженням за допомогою холодної технічної води. Розводять соляною кислотою або розчином їдкого натрію до значення рН близько 7 та зливають в загальнозаводську каналізаційну систему.

Вентиляційне повітря знезаражують. Тверді відходи виробництва у вигляді склобою, спецодягу, пакувального матеріалу утилізуються на міському сміттєзвалищі.

ПВ 14. Переробка відходів

Очищення повітря, яке містить залишки культуральної рідини з продуктами метаболізму або живі клітини мікроорганізмів, поступає на спеціальний сепаратор для відділення крапель й піни з подальшою очисткою від клітин мікроорганізмів в скрубєрі та повторного використання у якості вентиляційного чи технологічного повітря.

Фільтрувальні матеріали можуть бути повторно використані на виробництві при їх відновленні: відмочують їх в гарячій воді, очищують та оброблюють дезінфікуючими розчинами.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						70
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

4.4 Матеріальний баланс

Використано				Отримано			
Назва сировини, матеріалів та напівпродуктів	Кількість			Назва кінцевого продукту або напівпродукту, відходів та втрат	Кількість		
	кг	л	шт		кг	л	шт
Стадія ТП 7							
Поживне середовище		1728		Культуральна рідина	1824		
Посівний матеріал від ТП 5		192		Витрати з виносом повітря	96		
Всього:	1920			Всього:	1920		
Стадія ТП 8							
Культуральна рідиною після ТП 6	1824			Відділена біомаса	547		
				Фугат	1185		
				Втрати	92		
Всього:	1824			Всього:	1824		
Стадія ТП 9							
Аеросил	59			Імобілізований препарат	1219		
Відділений фугат	1185			Втрати	25		
Всього:	1244			Всього:	1244		

Продовження таблиці:

Стадія ТП 10

Імобілізований препарат	1219			Суспензія іммобілізований препарат	292		
				Фугат	902		
				Втрати	25		
Всього:	1219			Всього:	1219		

Стадія ТП 11

Суспензія іммобілізований препарат	292			Сухий препарат	26		
				Конденсат вода		260	
				Втрати	6		
Всього:	292			Всього:	292		

Стадія ПМВ 12

Сухий препарат іммобілізований	26			Розфасований та упакований готовий препарат, в тому числі:			
				препарат	25,74		
				пакети			52
				коробки			13
Поліетиленові пакети			52	Витрати при фасуванні	0,26		
Коробки			13				
Всього:	91			Всього:	91		

4.5 Контроль виробництва

Контроль виробництва здійснюється з метою отримання якісного продукту, що відповідає наведеним вище вимогам. Основні точки, параметри контролю та межі їх змін подані в таблиці:

Назва стадії та номер контрольної точки	Об'єкт контролю та показник, що вивчається	Метод контролю	Періодичність перевірки	Норматив на характеристика показника
1	2	3	4	5
ДР 2 Підготовка виробничих приміщень $K_T 2, K_{MB} 2$	Вміст мікроорганізмів у повітрі	Методами мікробіологічного аналізу	Кожну операцію	Кількість м/о ≤ 500 од/м ³ ,
ДР 3 Підготовка обладнання та комунікацій $K_T 3$	Тиск	Манометр	Кожну операцію	0,2 МПа
	Температура стерилізації	Регулятор температур		140°C
	Тривалість стерилізації	Годинник		1 год
ДР 4.1 Підготовка вентиляційного повітря $K_T 4.1$	Температура	Термометр	Протягом процесу	20°C
	Вологість	Психрометр технічний		W=40-60%
ДР 4.2 Підготовка стерильного повітря $K_T 4.2$	Тиск	Манометр	Протягом процесу	Стале задане значення
	Температура	Термометр		30°C

Продовження таблиці:

<p>ДР 5</p> <p>Підготовка поживних середовищ</p> <p>К_Т 5.1, К_{мб} 5.1, К_Т 5.2, К_{мб} 5.2</p>	Дозування компонентів	Дозуючий пристрій, ваговий метод	Кожну операцію	Згідно з технологією
	Температура кінцева	Термометр		28±1°C
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі та інкубування		Відсутність сторонньої мікрофлори
	Температура Тиск Тривалість	Термометр, манометр, годинник		121±1°C, 0,1 МПа, 20 хв.
<p>ТП 6</p> <p>Підготовка посівного матеріалу</p> <p>К_Т 6.1, К_{мб} 6.1, К_Т 6.2, К_{мб} 6.2, К_Т 6.3, К_{мб} 6.3</p>	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28±1°C
	Тривалість культивування	Годинник		120 год.
	Тиск в інокуляторі	Манометр		0,01 МПа
	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі, візуально	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори

Продовження таблиці:

ТП 7. Виробничий біосинтез Кт 7, Кмб 7	Мікробіологічна чистота	Висів на чашки Петрі та інкубування	Кожну операцію	Відсутність сторонньої мікрофлори
	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28±1°C
ТП 7. Виробничий біосинтез Кт 7, Кмб	Тиск у ферментері	Манометр		0,01 МПа
	Тривалість культивування	Годинник		72 год
ТП 9. Адсорбційна іммобілізація ферментного комплексу К _т 9, К _х 9	Температура	Термометр	Постійно протягом процесу	28±2°C
	Тривалість процесу	Годинник		30-45 хв
ТП 10. Відділення іммобілізованого препарату центрифугуванням К _т 10	Швидкість обертання	Тахометр	Постійно протягом процесу	10000 об/хв
	Тривалість процесу	Годинник		30 хв
ТП 11. Сушіння препарату розпилюючим способом К _т 11	Тривалість процесу	Годинник	Постійно протягом процесу	1-2 хв
	Температура	Термометр		150-90°C

Продовження таблиці:

ПМВ 12. Фасування та упаковка продукту К _Т 12	Маса у пакеті	Автоматично	Кожну операцію	0,5 кг
	Кількість пакетів у картонній коробці	Візуально	Кожну операцію	По 20 пакетів у коробці
ЗВ 13. Знешкодження відходів та промислових викидів К _х 13	Концентрація відходів	Кількісний хімічний та мікро- біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до санітарних правил і норм
ПВ 14. Переробка відходів К _х 14, К _Т 14	Наявність хімічних, механічних, мікро-біологічних забруднень	Кількісний хімічний та мікро- біологічний аналіз	Кожну операцію	Відповідно до НТД для даного матеріалу чи речовини

4.6 Технологічна схема виробництва

Технологічна схема виробництва подана на аркуші формату А1 у графічній частині дипломного проекту.

РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

5.1 Обґрунтування вибраної конструкції. Підбір конструкційних матеріалів для окремих елементів апарату

Проведення процесу вирощування посівного матеріалу використовують декілька етапів, поступово збільшуючи об'єм розмноження чистої культури, це може бути за прикладом на схемі [59]:



Схема 5.1 – Схема отримання посівного матеріалу

У стерильні пробірки, обрані за ГОСТ 1770-74 [60], з поживним середовищем висівають вихідну культуру та інкубують температурі $28 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 120 годин.

Конічні колби обирають згідно ГОСТ 25336-82 [61], тип Кн, об'ємом 1000 мл. Використовують колби Ерленмейера, що містять поживне середовище у стерильних умовах. Колби поміщують у термостаті на качалки та витримують їх протягом 72 годин при температурі при частоті обертання 220 об/хв. Наступний процес в посівному ферментері (інокуляторі) відбувається при за температури $28 \pm 1^\circ\text{C}$, що забезпечується подачею води технічної гарячої в сорочку апарата, протягом 72 годин.

Посівний матеріал оснащений механічним перемішуючим пристроєм – відкритою турбінною мішалкою із частотою обертання 220 об/хв та барботером, що забезпечує значну аерацію технологічним повітрям.

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. РОЗРАХУНОК ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ТЕХНОЛОГІЧНОГО	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Скобелева С.Р.					Д	77	120
Консультант	Фесенко С.В.					КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Тодосійчук Т.С.							
Затверд.								

- Вибір посівного ферментера

Сталеві або чавунні-емальовані реактори призначені для проведення різних фізико-хімічних процесів. Реактори є вертикальний циліндричний апарат об'ємом від 0,1 до 100 м³ і більше, забезпечені гладкою приварною пароводяною сорочкою або сорочкою з напівтруби.

Усередині апарату розташованих перемішувальний пристрій з турбінної відкритою мішалкою.

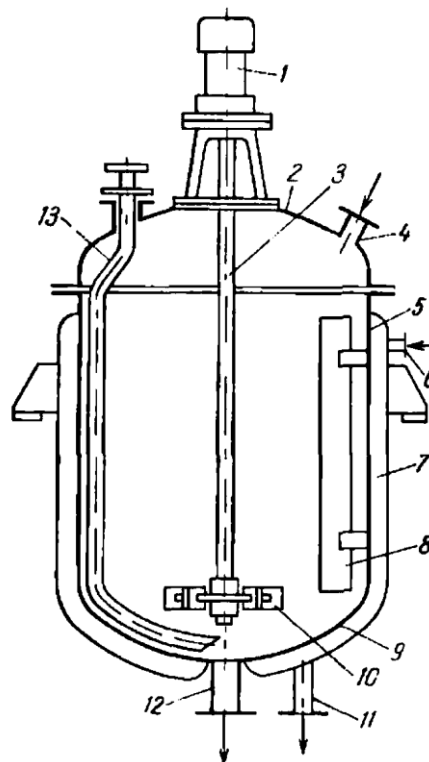
При застосуванні апаратів з сорочкою з напівтруб допускається робочий тиск до 1,6 МПа, в гладких приварних сорочках — не більше 0,4 МПа. В сорочку або змішувик можуть поступати водопровідна або оборотна вода, розчин насичується водяною пара або високотемпературним органічним теплоносієм. Реактори-змішувачі можуть бути роз'ємні або суцільнозварні з еліптичним днищем та кришкою. На апараті розташовані штуцери для входу теплоносія, переливу продукту, для труби перевалювання, технологічний штуцер, завантажувальний люк, штуцера для входу і виходу теплоносія та продукту, заощаджувальний клапан, штуцера для термометра. Після подачі в апарат заданої кількості води відбувається завантаження сипучих компонентів за допомогою гнучкого механічного транспортера. Нагрівання середовища до заданої температури проводиться автоматичними засобами управління.

Частота обертання мішалки складає 0,25-3,33 с⁻¹ в залежності від видів змішувального пристрою та властивостей перелічувальних компонентів.

При встановленні мішалки турбінного типу частота обертання 3-3,3 с⁻¹, рамного типу 0,33-1 с⁻¹, період мішалки здійснюється від електродвигуна нормального або вибухового крізь вертикальний редуктор.

Апарати виготовляють зі сальниковими ущільненнями для не токсичних і не вибухонебезпечних середовищ, що працює при атмосферному тиску, та з торцевим ущільненням типу ТДМ при надлишковому тиску до 0,6 МПа або під вакуумом до 40 кПа для токсичних, вогнебезпечні та вибухових середовищ [62].

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		78



1 – двигун з приводом; 2 – кришка; 3 – вал мішалки; 4 – штуцер для подачі зжатого повітря; 5 – корпус; 6 та 11 – штуцери для входу и виходу теплоносія; 7 – сорочка; 8 – відбивач перегородок; 9 – днище; 10 – мішалка; 12 – штуцер для зливу продукту; 13 – труба перемішуюча

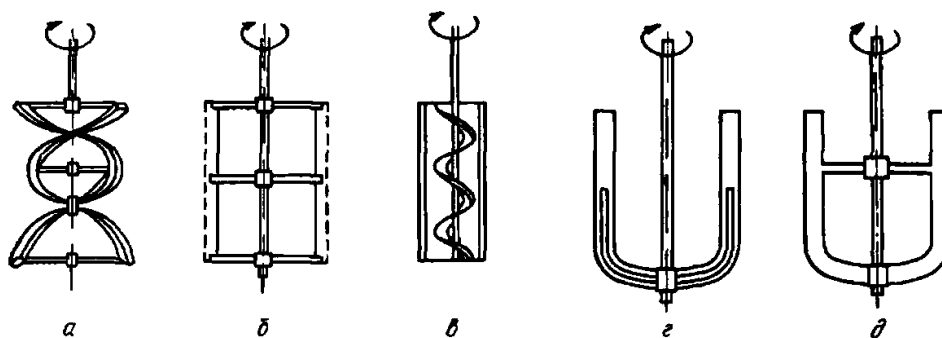
Рисунок 5.1 – Апарат з мішалкою

Корпус апарату (рисунок 5.1) зазвичай складається з вертикальної циліндричної обичайки 5, кришки 2, на якій встановлений привід мішалки 1, і днища 9. Апарати, робочий тиск в яких відрізняється від атмосферного, мають, як правило, еліптичне днище і кришки, причому в апаратах великого діаметра кришки і днища виконують нероз'ємними (суцільнозварними з корпусом), а для внутрішнього огляду і чищення таких апаратів на кришці встановлюють люки значно великого діаметра.

Для підведення і відведення теплоти корпус апарату постачають сорочкою 7. Приводом переміщуючого пристрою служить електродвигун, з'єднаний з валом мішалки прямим або заниженою передачею. Для зменшення частоти обертання валу мішалки в порівнянні з валом електродвигуна застосовують різні по влаштуванню редуктори.

- Вибір мішалки

Конструктивним елементом, що приводить рідину в рух є мішалка. Як показує практика, більшість завдань перемішування може бути успішно вирішено шляхом використання обмеженого числа конструкцій мішалок. При цьому існують найбільш характерні області застосування і діапазони геометричних співвідношень окремих типів мішалок. Наприклад, для перемішування високов'язких середовищ при ламінарному режимі використовують стрічкові, скребкові та шнекові мішалки (рисунок 5.2, а, б, в). Скребкові мішалки застосовують переважно для інтенсифікації теплообміну; скребки кріплять за допомогою пружин, тим самим забезпечуючи щільне прилягання їх до стінки апарата. Для перемішування рідин порівняно невисокою вязкоті (зазвичай при підводі теплоти, тобто в апаратах з сорочкою) застосовують тихохідні мішалки - якірні або рамні (рисунок 5.2, г, д). Співвідношення D/d , у цих мішалок невелика (1,05-1,25), тому їх часто використовують при перемішуванні суспензій, частки якого характеризуються схильністю до налипання на стінки.

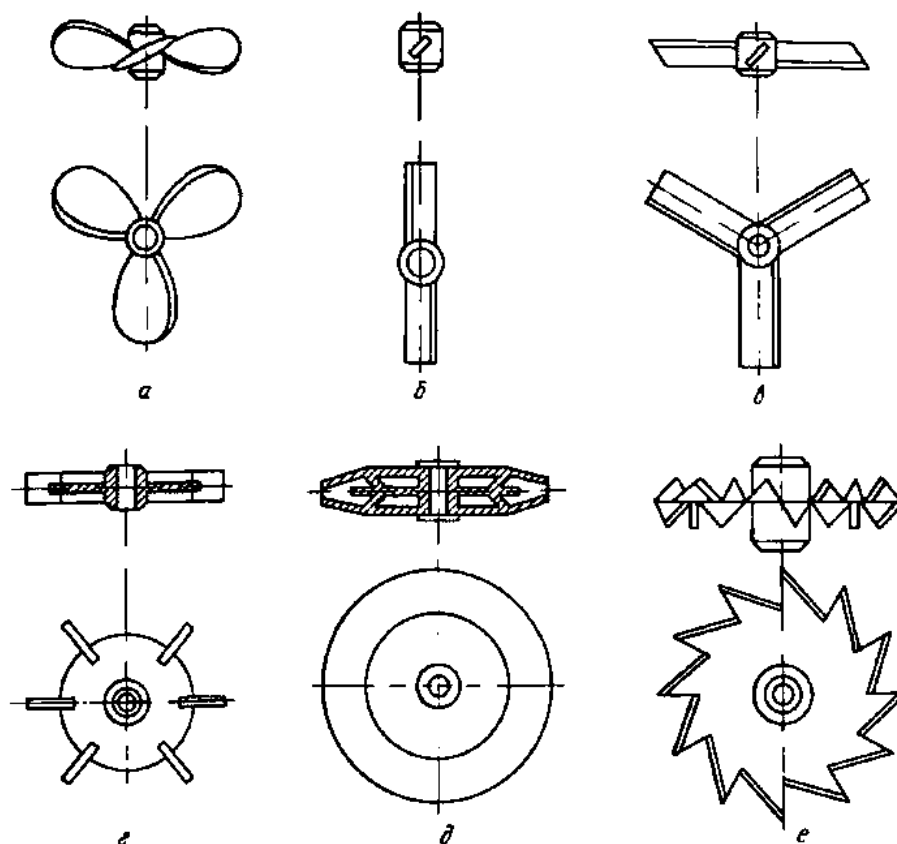


(а-в) та середовищ середньої в'язкості (г,д)

а – стрічкова; б – скребкова; в – шнекова з направляючої трубою; г – якірна; д - рамна

Рисунок 5.2 – Мішалки для перемішування високов'язких середовищ
Швидкохідні лопатеві, турбінні, пропелерні мішалки (рисунок 5.3) зазвичай мають відношення $D/d > 1,5$. Вони розрізняються здатністю створювати осьовий циркуляційний перебіг. У апаратах без внутрішніх

пристроїв ці мішалки забезпечують помповий ефект, вдвічі перевищує помповий ефект звичайних мішалок.



а – пропелерна; б – дволопатева; в – трилопатева; г – турбіна відкрита;
д – турбіна закрита; е - фрезерна

Рисунок 5.3 – Швидкохідні мішалки

Якірні мішалки мають форму, відповідну внутрішньої поверхні реактора. Їх діаметр близький до внутрішнього діаметра апарата. Вони служать для перемішування в'язких рідин. При обертанні лопаті постійно очищають стінки і дно апарату.

Якірні мішалки (рисунок 5.2, г) виготовляють в нормальному або посиленому виконанні. Пристрої складаються з вигнутих за формою якоря лопатей, приварених до розбірний ступиці. Для додання жорсткості до лопат приварюють ребра. При посиленому виконанні до верхньої ступиці приварюють перекладину з ребрами.

Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ДП 6215 00 000 ПЗ

Арк.

81

Якірні мішалки застосовують при $\mu c = 1 \div 10000 \text{ (МН} \times \text{с)}/\text{м}^2$ і $v = 0,5 \div 5,5 \text{ м/с}$ для перемішування в'язких і важких рідин, інтенсифікації теплообміну, запобігання випаданню осаду на стінках апаратів.

Рамні мішалки як і якірні міцні і призначені для в'язких рідин. Складаються з декількох лопатей, з'єднаних у вигляді рами для перемішування широких по всій товщині апарату шарів рідини ($n = 1,3 \text{ об / с}$).

Рамні мішалки складаються (рисунок 5.2, д) з двох лопатей, приварених до нижньої розбірний ступиці, і двох перекладин, приварених до верхньої і середньої маточини. Для додання жорсткості до лопат і поперечин з обох сторін приварюють ребра.

Рамні пристрої застосовують для тих же цілей, що і якірні, при $\mu c = 10 \div 10000 \text{ (МН} \times \text{с)}/\text{м}^2$ і $v = 0,8 \div 7 \text{ м/с}$ або при $\mu c = 10000 \div 40000 \text{ (МН} \times \text{с)}/\text{м}^2$ і $v = 0,8 \div 4 \text{ м/с}$.

Пропелерні мішалки, принцип роботи яких представлено на рисунок 5.3, (а), мають гвинтоподібно вигнуті лопаті - кут нахилу по довжині від 45° у маточини вала до 20° на кінці лопаті. Тому різні ділянки лопасті під різним кутом зустрічають рідину і створюють інтенсивні осьові вертикальні потоки, що призводить до захоплення всіх її шарів і забезпечує перемішування у всьому обсязі апарата. Швидкість обертання для вузьких, рідин становить 2-8 об / с, для рухливих - 3-30 об / с.

Пропелерні мішалки застосовують при $\mu c = 1 \div 100 \text{ (МН} \times \text{с)}/\text{м}^2$ і $v = 3,8 \div 16 \text{ м/с}$.

Лопатеві мішалки складаються з двох або більшої кількості лопатей, розташованих перпендикулярно або похило до осі вала. Швидкість кінця лопаті становить 1-5 м/с, тому перемішуються тільки шари, що знаходяться в безпосередній близькості від лопатей, створюючи ламінарні, радіальні потоки рідини. Вони застосовуються для перемішування рідин з малою в'язкістю. Для збільшення обсягу перемішуються шарів створюються багаторядні (багатоярусні) мішалки, коли на одному валу кріпиться кілька лопатей на різній висоті. Для збільшення осьових потоків лопаті роблять похилими. До

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		82

лопатеvim відносяться мішалки спеціального призначення: якірні, рамні і планетарні.

Лопатеві мішалки складаються (рисунок 5.3, б) з двох лопатей, приварених до маточини. Маточину збирають з двох половин, що з'єднуються чотирма болтами, і встановлюють за допомогою шпоночно з'єднання на валу. Також випускають посилені лопатеві мішалки у яких до лопат і маточини приварюють горизонтальні ребра.

Лопатеві мішалки застосовують при в'язкості середовища $\mu c = 1 \div 3000$ (МН \times с)/м² і для перемішування взаємно розчинних рідин; зважування твердих частинок в рідині з масовим вмістом їх до 90%; повільного розчинення кристалічних, аморфних або волокнистих речовин; вирівнювання температур; перемішування в процесах кристалізації.

Турбінні мішалки можуть бути відкритого і закритого типу з плоскими і похилими лопатями. Вони створюють переважно радіальні і осьові потоки рідини, забезпечуючи інтенсивне перемішування у всьому обсязі ($n = 2 - 30$ об/с). Круговий (тангенціальне) рух рідини поступово починає переважати, утворюючи «воронку» і може наступити момент, коли швидкість обертання мішалки буде дорівнює швидкості кругового руху рідини. В цьому випадку ефективність перемішування буде зведена до мінімуму. Тому швидкість обертання мішалок не повинна перевищувати мінімального значення.

Вони являють собою диск, в центрі якого уварена маточина. До диску приварені прямокутні лопаті. Закрита конструкція має лопаті з конічними зрізами, до яких приварені верхній і нижній конуси.

Відкриті турбінні мішалки застосовують при $\mu c = 1 \div 40000$ (МН \times с)/м² і $v = 2,5 \div 10$ м/с, закриті - при $\mu c = 1 \div 25000$ (МН \times с)/м² і $v = 2,5 \div 12$ м/с [5,6]

Для організації потоку найбільш часто використовують відбивні перегородки, основне призначення яких – зменшення окружної складової швидкості при відповідному збільшенні осьової радіальної складових.

Для збільшення в апараті помпового ефекту служать напрямні труби (дифузори). Їх застосовують як при ламінарному, так і при турбулентному

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		83

режимі перемішування, причому в першому випадку в поєднанні зі шнековими, а в другому пропелерними (гвинтовими) мішалками.

Як внутрішні теплообмінні пристрої в апаратах об'ємом менш як 5 м³ змійовик зазвичай встановлюють співвісно з валом пристроями, а в апаратах великого обсягу може бути використано кілька змійовиків, розташованих по периферії. Концентричне розташування двох і більше змійовиків небажано через погіршення перемішування і теплообміну в міжтрубному просторі [53].

Отже, було обрано турбінну відкриту мішалку, яка відноситься до швидкохідних мішалок та має ряд переваг.

Вимоги до матеріалів згідно ГОСТ 20680—86 [64]:

Матеріали повинні мати сертифікати, що підтверджують основні характеристики їх марок. При відсутності сертифікатів матеріали повинні бути піддані випробуванням на заводі-виробнику для виявлення відповідності хімічного складу і механічних властивостей нормативно-технічних документів.

Вуглецева кипляча сталь не повинна застосовуватися для елементів і апаратів, що працюють під тиском і дотичних з зрідженими газами; з вибухо- і пожежонебезпечними середовищами; середовищами високої токсичності, середовищами, що викликають корозійне розтріскування, сірководневі розтріскування або розшарування.

Деталі перемішувальних пристроїв, дотичні з робочим середовищем, повинні виготовлятися з матеріалів з корозійною стійкістю не нижче, ніж у матеріалу корпусу.

Вибір матеріалу для виробництва апарату

При конструюванні апаратури конструкційні матеріали повинні відповідати наступним основним вимогам:

1. Достатня загальна хімічна і корозійна стійкість матеріалу в агресивному середовищі з заданими параметрами по концентрації середовища, її температурі і тиску, при яких здійснюється технологічний

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		84

процес, а також стійкість проти інших можливих видів корозійного руйнування .

2. Достатня механічна міцність для заданого тиску і температури технологічного процесу з урахуванням специфічних вимог, що з'являються при випробуванні апаратів на міцність, герметичність і т.д. і в експлуатаційних умовах при дії на апарати різного роду додаткових навантажень (вітрове навантаження, прогин від власної ваги і т.д.).

3. Краща здатність матеріалу зварюватись, забезпечуючи високі механічні властивості зварних з'єднань і корозійну стійкість їх в агресивному середовищі, обробка тиском, піддаватися вигину.

4. Низька вартість матеріалу, не дефіцитність та можливість отримання без освоєння промисловості. Необхідність докладання зусиль для реалізації двошарові сталі, сталі з покриттям з неметалічних матеріалів.

Застосовуємо для виготовлення виробничого апарату сталь 12Х18Н10Т. Міцність нержавіючої сталі цього класу вкрай висока, що підтверджує термін її експлуатації. Твердість матеріалу становить НВ 10¹-179 Мпа. При цьому питома вага сталі – 7920 кг/м³.

Що стосується температури, то кування здійснюється при 1200°С на початку процесу і при 850°С в кінці закалювання здійснюється при режимі 1050-1100°С. Відноситься до 2 -3 групі стійкості при температурі 650°С і до 4-5 при температурі 750°С. Зварюваність марки не має ніяких обмежень [65,66].

5.2 Технологічний, конструктивний, гідравлічний розрахунки

Необхідно розрахувати інокулятор для посівного матеріалу. Робочий об'єм апарату – $V = 0,4 \text{ м}^3$, коефіцієнт заповнення – $\varphi = 0,5$. Температура в апараті підтримується на рівні $t_c = 28 \text{ }^\circ\text{C}$. Витрати повітря у посівному апараті складають $V_r = 3 \text{ м}^3/\text{с}$.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		85

5.2.1 Розрахунок реактора

Номінальний об'єм апарату розраховуємо за формулою:

$$V_H = \frac{V_p}{K_3} \text{ м}^3 \quad (5.1)$$

$$V_p = V_H \cdot K_3 = 0,4 \cdot 0,5 = 0,2 \text{ м}^3.$$

де K_3 – коефіцієнт заповнення ферментеру.

За ГОСТ 20680-86 приймаємо внутрішній діаметр апарату:

$$D_{\text{вн}} = 800 \text{ мм} = 0,8 \text{ м}.$$

Висота корпусу:

$$H = 950 \text{ мм} = 0,95 \text{ м}.$$

Висота еліптичної частини днища:

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot D_{\text{вн}} \quad (5.2)$$

$$h_{\text{ел.дн}} = 0,25 \cdot 0,8 = 0,2 \text{ м}.$$

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533–78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату [68]:

$$h_{\text{о.дн}} = 40 \text{ мм} = 0,04 \text{ м} – \text{висота основи еліптичного днища}.$$

$$h_{\text{н}} = 200 \text{ мм} = 0,2 \text{ м}.$$

$$S_{\text{дн}} = 14 \text{ мм} = 0,014 \text{ м} – \text{товщина стінки еліптичного днища}.$$

$$F_{\text{вн.дн}} = 0,79 \text{ м}^2 – \text{внутрішня поверхня еліптичного днища}.$$

$$V_{\text{дн}} = 86,8 \text{ дм}^3 = 0,0869 \text{ м}^3 – \text{об'єм еліптичного днища}.$$

$$m = 145,8.$$

$$h_{\text{дн}} = h_{\text{ел.дн}} + h_{\text{о.дн}} = 200 + 40 = 240 \text{ мм} – \text{повна висота днища}.$$

Повний об'єм ферментера:

$$V = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}} \quad (5.3)$$

Звідси об'єм циліндричної частини:

$$V_{\text{ц}} = V + 2 \cdot V_{\text{дн}} = 0,2 + 2 \cdot 0,0869 = 0,3738 \text{ м}^3$$

Висота циліндричної частини апарату:

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}}}{F} \quad (5.4)$$

$$H_{\text{ц}} = \frac{V_{\text{ц}} \cdot 4}{\pi \cdot D_{\text{вн}}^2} = \frac{0,3738 \cdot 4}{3,14 \cdot 0,8^2} = 0,744 \text{ м}.$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		86

Висота рідини в циліндричній частині:

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot K_3 \cdot V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D_{\text{BH}}^2} \quad (5.5)$$

$$H_{\text{рц}} = \frac{4 \cdot 0,5 \cdot 0,744}{3,14 \cdot 0,8^2} = 0,238 \text{ м.}$$

Висота стовпа рідини в апараті:

$$H_{\text{р}} = H_{\text{рц}} + h_{\text{дн}} \quad (5.6)$$

$$H_{\text{р}} = 0,238 + 0,24 = 0,478 \text{ м.}$$

Загальна висота ферментера без штуцерів, безопор:

$$H_{\text{заг}} = H_{\text{ц}} + 2 \cdot h_{\text{дн}} \quad (5.7)$$

$$H_{\text{заг}} = 0,744 + 2 \cdot 0,24 = 1,224 \text{ м.}$$

Обираємо ферментер для вирощування посівного матеріалу з відкритою турбінною мішалкою та кільцевим барботером.

За ГОСТ 6533-78 «Основні співвідношення розмірів перемішуючих пристроїв» для відкритої турбінної мішалки [68]:

$$D/d_M = 3:5;$$

$$h_M/d_M = 0,2;$$

$$h/d_M = 0,4;$$

$$l/d_M = 0,25;$$

$$b/d_M = 0,1;$$

$$\xi M = 8,4$$

Діаметр перемішуючого пристрою визначаємо за:

$$\frac{D}{d_M} = 3:5$$

$$d_M = \frac{D}{3} = \frac{1600}{3} = 533 \text{ мм.}$$

За ГОСТ 20680-86 округляємо даний d_M до стандартного [69]:

Діаметр перемішуючого пристрою визначаємо за:

$$\frac{D}{d_M} = 3:5$$

$$d_M = \frac{D}{3} = \frac{800}{3} = 267 \text{ мм.}$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		87

За ГОСТ 20680-75 округляємо даний d_M до стандартного:

$$d_M = 280 \text{ мм} = 0,28 \text{ м.}$$

Висота лопатей:

$$b_L = 0,2 \cdot d_M = 0,2 \cdot 0,28 = 0,056 \text{ м.}$$

Довжина лопаті:

$$L_L = 0,25 \cdot d_M = 0,25 \cdot 0,28 = 0,07 \text{ м.}$$

Висота від днища до мішалки:

$$h = 0,5 \cdot d_M = 0,5 \cdot 0,28 = 0,14 \text{ м.}$$

Критерій опору: $\xi_M = 8,4$

Кутова швидкість:

$$\omega = \pi \cdot d_M \cdot n = 3,14 \cdot 0,28 \cdot 3,67 = 3,226 \text{ м/с.}$$

$$n = 3,67 \text{ с}^{-1}.$$

Для визначення необхідності встановлення відбиваючих перегородок розрахуємо глибину воронки:

Критерій Рейнольдса:

$$Re = \frac{\rho_p \cdot n \cdot d_M^2}{\mu_p} \quad (5.8)$$

$$Re = \frac{1056 \cdot 3,67 \cdot 0,28^2}{1,15 \cdot 10^{-3}} = 9,42 \cdot 10^5.$$

5.2.2 Розрахунок глибини воронки

Параметр висоти завантаження апарата :

$$\gamma(\Gamma) = 8 \cdot \frac{H_p}{D} + 1 \quad (5.9)$$

$$\gamma(\Gamma) = 8 \cdot \frac{0,478}{0,8} + 1 = 1,026$$

Параметр гідравлічного опору мішалки E:

$$E = \frac{\gamma}{\xi_M z_M Re_u^{0,25}} \quad (5.10)$$

$$E = \frac{1,026}{8,4 \cdot 1 \cdot (9,42 \cdot 10^5)^{0,25}} = 0,0039.$$

де ξ_M – критерій опору; z – кількість мішалок на валу.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		88

За значенням параметру E на рис. 2.5 знаходять параметр розподілення швидкості ψ_1 [70].

$$\psi_1 = -1.$$

За значенням параметру ψ_1 [70] знаходять параметр глибини воронки B .

Параметр глибини воронки $B = f(\psi_1)$.

$$B = 17.$$

Глибина воронки в реакторі без відбиваючих перегородок:

$$h_g = \frac{B \cdot n^2 \cdot d_m^2}{2} \quad (5.11)$$

$$h_g = \frac{17 \cdot 1^2 \cdot 0,28^2}{2} = 0,666 \text{ м.}$$

де B – параметр, значення якого визначається з номограми в залежності від E і типу мішалку.

Так як глибина воронки вище допустимого значення необхідне встановлення відбиваючих перегородок.

Розрахуємо ширину перегородки:

$$b = 0,1 \cdot d_m = 0,1 \cdot 0,28 = 0,028 \text{ мм.}$$

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{гр} = H_p - h = 0,478 - 0,14 = 0,338 \text{ м.}$$

де h – висота встановлення мішалки над днищем.

Якщо виконується співвідношення, то в апараті встановлюються перегородки.

$$h_v > h_{гр}$$

$$0,666 > 0,338.$$

Співвідношення виконується, отже необхідно встановлювати перегородки.

5.2.3 Розрахунок потужності, що витрачається на перемішування

Потужність приводу перемішуючого пристрою:

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		89

$$N_{ел} = \frac{K_n \cdot K_H \cdot \sum K_i \cdot N \cdot N_{ущ}}{\varphi} \quad (5.12)$$

де K_n – коефіцієнт, що вказує на присутність в апараті відбиваючих перегородок ($K_n = 1$); K_H – коефіцієнт рівня рідини в апараті; K_i – коефіцієнт, що враховує наявність в апараті внутрішніх пристроїв ($K_i = 1,1$); N – потужність, що витрачається на перемішування; $N_{ущ}$ – потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки; φ – ККД двигуна ($\varphi = 0,85..0,9$).

Для визначення потужності, що витрачається на перемішування необхідно визначити коефіцієнт K_n , який визначається в залежності від значення коефіцієнта Рейнольдса за формулою 5.8:

$$Re = \frac{3 \cdot 0,28^2 \cdot 1056}{1,15^{-3}} = 2,571 \cdot 10^5.$$

За графіком нормалі [70] знаходимо значення $K_N = f(Re_u)$:

$$K_N = 7.$$

Потужність, що витрачається на перемішування:

$$N = K_n \cdot \rho_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 \quad (5.13)$$

$$N = 7 \cdot 1056 \cdot 1^3 \cdot 0,28^5 = 12,72 \text{ Вт.}$$

Значення d_b можна наближеним співвідношенням:

$$d_b = C \cdot d_m \quad (5.14)$$

$$d_b = 0,117 \cdot 0,28 = 0,032 \text{ м.}$$

$d_b = 0,04$ м, як найближче стандартне число.

Визначаємо потужність, що витрачається на подолання тертя ущільнення валу мішалки:

$$N_{ущ} = 6020 \cdot d_g^{1,3} \quad (5.15)$$

$$N_{ущ} = 6020 \cdot 0,04^{1,3} = 91,67 \text{ Вт.}$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

$$K_N = \sqrt{\frac{H_p}{D}} \quad (5.16)$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						90
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$K_N = \sqrt{\frac{0,478}{0,8}} = 0,773$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

$$N_p = k_1 \cdot k_2 \cdot (\sum k + 1) \cdot N_m \quad (5.17)$$

де k_2 – коефіцієнт, що враховує збільшення потужності, що споживається, при пуску чи в результаті збільшення опору середовища при перемішуванні, приймаємо $k_2 = 1,1$.

Коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення апарату середовищем:

$$k_1 = \frac{H_p}{D_{BH}} \quad (5.18)$$

$$k_1 = \frac{0,478}{0,8} = 0,6.$$

Сума коефіцієнтів, що враховують збільшення потужності через наявність в апараті допоміжних пристроїв :

$$\sum k = 0,6 + 1,1 + 0,1 = 1,8$$

Тоді :

$$N_p = 0,6 \cdot 1,1 \cdot (1,8 + 1) \cdot 12,72 = 23,4 \text{ Вт.}$$

Потужність привода мішалки визначають за формулою 5.12:

$$N_{ел} = \frac{K_N K_n \cdot \sum K_i \cdot N \cdot N_{ущ}}{\eta} = \frac{0,773 \cdot 1,2 \cdot 2 \cdot 12,72 \cdot 91,67}{0,9} = 2204 \text{ Вт.}$$

5.2.4 Тепловий розрахунок реакторів

В процесах нагрівання (охолодження) середовища в реакторах тепла енергія підводиться (відводиться) теплоносієм, що поступає в теплообмінні пристрої апарата: сорочку або (та) зміювик.

Теплота, що підводиться до середовища в реакторі (нагрівання) або відводиться від нього (охолодження) визначається з рівняння теплового балансу. Розглянемо розрахункові залежності для визначення складових теплового балансу.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		91

Розрахунок об'ємів поживного середовища і посівного матеріалу:

$$V_p = V_{\text{пм}} + V_{\text{пс}} \quad (5.19)$$

$$V_{\text{пс}} = 0,9 \cdot V_p = 0,9 \cdot 0,2 = 0,18 \text{ м}^3$$

$$V_{\text{пм}} = 0,1 \cdot V_p = 0,1 \cdot 0,2 = 0,02 \text{ м}^3$$

$$\rho_{\text{пм}} = \rho_{\text{пс}} = \rho_{\text{кр}}$$

$$c_{\text{пм}} = c_{\text{пс}} = c_{\text{кр}} = 3820 \frac{\text{Дж}}{\text{кг} \cdot \text{К}}$$

Розрахунок маси поживного середовища, посівного матеріалу та культуральної рідини:

$$M_x = \rho_x \cdot V_x \quad (5.20)$$

$$M_{\text{пс}} = \rho_{\text{пс}} \cdot V_{\text{пс}} = 1056 \cdot 0,18 = 190 \text{ кг}$$

$$M_{\text{пм}} = \rho_{\text{пм}} \cdot V_{\text{пм}} = 1056 \cdot 0,02 = 21 \text{ кг}$$

$$M_{\text{кр}} = \rho_{\text{кр}} \cdot V_{\text{кр}} = 1056 \cdot 0,2 = 211 \text{ кг}$$

Надходження енергії у ферментер для вирощування посівного матеріалу відбувається[71]:

1) з поживним середовищем:

$$E_{\text{пс}} = M_{\text{пс}} \cdot c_{\text{пс}} \cdot t_{\text{пс}} \quad (5.21)$$

$$E_{\text{пс}} = 190 \cdot 3820 \cdot 28 = 20,33 \text{ МДж.}$$

2) з посівним матеріалом:

$$E_{\text{пм}} = M_{\text{пм}} \cdot c_{\text{пм}} \cdot t_{\text{пм}} \quad (5.22)$$

$$E_{\text{пм}} = 21 \cdot 3927 \cdot 28 = 2,32 \text{ МДж.}$$

3) з повітрям:

$$E_{\text{пов}_1} = M_{\text{пов}} \cdot c_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{Г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot c_{\text{пов}} \cdot t_{\text{пов}} \quad (5.23)$$

де $\rho_{\text{пов}} = 1,173 \text{ кг/м}^3$ – густина повітря при температурі 28°C ,

$c_{\text{пов}} = 100,5 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність повітря,

$t_{\text{пов}} = 28^\circ\text{C}$ – початкова температура повітря,

$\tau_{\text{пр}} = 48 \text{ год} = 172800 \text{ с}$ – тривалість процесу культивування,

$V_{\text{Г}} = 0,016 \text{ м}^3/\text{с}$ – витрати повітря,

$$E_{\text{пов}_1} = 1,173 \cdot 0,016 \cdot 172800 \cdot 100,5 \cdot 28 = 9,126 \text{ МДж.}$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		92

4) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від перемішуючих пристроїв:

$$E_{\text{дис}_1} = N_{\text{уст}} \cdot \tau_{\text{пр}} \quad (5.24)$$

де N – потужність, що витрачається на перемішування Вт;

$\tau_{\text{пер}}$ – час перемішування, с.

$$E_{\text{дис}_1} = 100 \cdot 172800 = 17,28 \text{ МДж.}$$

5) теплота, що виділяється в результаті дисипації механічної енергії від повітря:

$$E_{\text{дис}_2} = V_{\text{г}} \cdot \Delta p \cdot \tau_{\text{пр}} = V_{\text{г}} \cdot \rho_{\text{с}} \cdot g \cdot H_{\text{р}} \cdot \tau_{\text{пр}} \quad (5.25)$$

$$E_{\text{дис}_2} = 0,016 \cdot 1056 \cdot 9,81 \cdot 1,16 \cdot 178800 = 13,7 \text{ МДж.}$$

В живильному середовищі (15% розчин м'яса) кількість сухих речовин становить:

$$m_{\text{нс}} = M_{\text{нс}} \cdot 0,15\% = 190 \cdot 0,15 = 28,5 \text{ кг.}$$

Вміст цукру в м'ясі складає 44%, тому:

$$m_{\text{ц}} = 28,5 \cdot 0,44 = 12,6 \text{ кг цукру}$$

Оскільки за 1 кг згорання цукру виділяється 3744 ккал тепла, то теплота реакції.

$$E_{\text{р}} = m_{\text{ц}} \cdot r = 12,6 \cdot 3744 \cdot 4,19 = 196720 \text{ Дж}$$

Сумарна кількість надходжень теплоти у ферментер [71]:

$$\sum E_{\text{надх}} = E_{\text{пс}} + E_{\text{пм}} + E_{\text{пов}_1} + E_{\text{дис}_1} + E_{\text{дис}_2} + E_{\text{р}} \quad (5.26)$$

$$\sum E_{\text{надх}} = 20,33 + 2,32 + 9,12 + 17,28 + 13,7 + 196720 = 219703 \text{ Дж.}$$

Витрати теплової енергії здійснюються:

1) з культуральною рідиною:

$$E_{\text{к}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}} \quad (5.27)$$

$$E_{\text{к}} = M_{\text{пм}} \cdot C_{\text{к}} \cdot t_{\text{к}} = 21 \cdot 3820 \cdot 28 = 2,25 \text{ МДж,}$$

де $C_{\text{к}} = 3820 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність культуральної рідини,

$t_{\text{к}} = 28^\circ\text{C}$ – температура культуральної рідини,

2) з повітрям:

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		93

$$E_{\text{пов}_2} = M_{\text{пов}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c = \rho_{\text{пов}} \cdot V_{\text{г}} \cdot \tau_{\text{пр}} \cdot C_{\text{пов}} \cdot t_c \quad (5.28)$$

$$E_{\text{пов}_2} = 1,173 \cdot 0,016 \cdot 172800 \cdot 100,5 \cdot 28 = 9,126 \text{ МДж.}$$

3) втрати теплоти в навколишнє середовище при нагріванні:

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2}) \quad (5.29)$$

$$E_{\text{втр}} = 0,02 \cdot (2,25 + 9,12) = 0,227 \text{ МДж.}$$

Сумарні витрати становлять:

$$\sum E_{\text{витрат}} = E_{\text{к}} + E_{\text{пов}_2} + E_{\text{втр}} \quad (5.30)$$

$$\sum E_{\text{витрат}} = 2,25 + 9,12 + 0,227 = 11,61 \text{ МДж.}$$

Теплове навантаження у ферментері становить:

$$E_{\text{т}} = \sum E_{\text{витрат}} - \sum E_{\text{надх}} \quad (5.31)$$

$$E_{\text{т}} = 11,61 - 0,219702 = 11,39 \text{ МДж.}$$

Тобто у посівному апараті відбувається охолодження ($E_m > 0$), отже для підтримання температури культивування необхідно його нагрівання.

$$Q = |E_{\text{т}}| = 11,39 \text{ МДж.}$$

$$Q = M_{\text{т}} \cdot C_{\text{т}} \cdot (t_{\text{тп}} - t_{\text{тк}}) \quad (5.32)$$

Звідки:

$$M_{\text{т}} = \frac{Q}{C_{\text{т}} \cdot \Delta t_{\text{т}}};$$

де $C_m = 4200 \text{ Дж/кг} \cdot \text{K}$ – питома теплоємність теплоносія,

$\Delta t_m = 10^\circ\text{C}$ – різниця між початковою та кінцевою температурами теплоносія,

$$M_{\text{т}} = \frac{11,39 \cdot 10^6}{4200 \cdot 10} = 276 \text{ кг.}$$

Масові витрати теплоносія:

$$G_{\text{т}} = \frac{M_{\text{т}}}{\tau_{\text{пр}}} \quad (5.33)$$

$$G_{\text{т}} = \frac{276}{172800} = 0,0015 \text{ кг/с.}$$

Визначаємо початкову та кінцеву температури теплоносія. Оскільки у ферментері відбувається процес нагрівання, то:

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						94
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$t_p - \Delta t_{cp} = t_T.$$

де, $\Delta t_{cp} = 10^\circ\text{C}$. Тоді:

$$t_{\text{ТП}} = 18^\circ\text{C};$$

$$t_{\text{ТК}} = 28^\circ\text{C}.$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у посівному апараті та коефіцієнт теплопередачі.

Коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія:

$$a = \frac{D_c - 2\delta_{\text{ст}} - D}{2} \quad (5.34)$$

де $\delta_{\text{ст}} = 0,006$ м – товщина стінки,

$D_c = 0,9$ м – діаметр сорочки ферментера,

$$a = \frac{0,9 - 2 \cdot 0,006 - 0,8}{2} = 0,044 \text{ м.}$$

$$b = 0,15 - a = 0,15 - 0,044 = 0,106 \text{ м.}$$

Еквівалентний діаметр:

$$d_{\text{екв}} = \frac{2ab}{a+b} \quad (5.35)$$

$$d_{\text{екв}} = \frac{2 \cdot 0,044 \cdot 0,106}{0,044 + 0,106} = 0,062 \text{ м.}$$

Середній діаметр ферментера:

$$D_{cp} = D_c - a \quad (5.36)$$

$$D_{cp} = 0,9 - 0,044 = 0,856 \text{ м.}$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_c = \frac{d_M}{\nu_c} (nd_M + 4W_\Gamma) \quad (5.37)$$

$$W_\Gamma = \frac{4V_\Gamma}{\pi D^2} \quad (5.38)$$

$$W_\Gamma = \frac{4 \cdot 0,016}{3,14 \cdot 0,8^2} = 0,031 \text{ м/с.}$$

Тоді:

$$Re_c = \frac{0,28}{1,01 \cdot 10^{-6}} (3,67 \cdot 0,28 + 4 \cdot 0,031) = 3,2 \cdot 10^5.$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		95

Критерій Прандтля:

$$Pr_c = \frac{\mu_c \cdot c_c}{\lambda_c} \quad (5.38)$$

$$Pr_c = \frac{1,15 \cdot 10^{-3} \cdot 3820}{0,545} = 8,060.$$

Критерій Фруда:

$$Fr_c = \frac{n^2 \cdot d_m}{g} \quad (5.39)$$

$$Fr_c = \frac{(3,67^2 \cdot 0,28)}{9,81} = 0,384.$$

Критерій Нуссельта визначаємо з критеріального рівняння:

$$Nu_c = 1,35 Re_c^{0,59} \cdot Pr_c^{0,38} \left(\frac{\mu_c}{\mu_{ст}} \right)^{0,14} Fr_c^{0,1} \quad (5.40)$$

$$Nu_c = 1,35 \cdot (3,2 \cdot 10^5)^{0,59} \cdot 8,060^{0,38} \cdot 1 \cdot 0,384^{0,1} = 5727$$

Коефіцієнт тепловіддачі від культуральної рідини у ферментері становить:

$$\alpha = \frac{Nu \cdot \lambda}{D} \quad (5.41)$$

$$\alpha_c = \frac{5727 \cdot 0,545}{0,8} = 3901 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}.$$

Визначаємо коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія.

Об'ємні витрати теплоносія:

$$V_T = \frac{G_T}{\rho_T} \quad (5.42)$$

де $\rho_m = 996$ – густина теплоносія при температурі $t_m = 28^\circ\text{C}$.

$$V_T = \frac{0,015}{996} = 0,000016 \text{ м}^3/\text{с}.$$

Швидкість руху теплоносія:

$$W_T = \frac{V_T}{ab} \quad (5.42)$$

$$W_T = \frac{0,0000016}{0,044 \cdot 0,106} = 0,0011 \text{ м/с}.$$

Критерій Рейнольдса:

$$Re_T = \frac{W_T d_{екв}}{\nu_T} \quad (5.44)$$

де $\nu_m = 1,01 \cdot 10^{-6} \text{ м}^2/\text{с}$ – кінематична в'язкість теплоносія при температурі $t_m = 20^\circ\text{C}$,

$$Re_T = \frac{0,0011 \cdot 0,062}{1,01 \cdot 10^{-6}} = 675,2.$$

Так як $Re_m < 10000$, то критерій Нуссельта визначаємо за критеріальним рівнянням:

$$Nu_T = 0,037 Re_T^{0,8} \cdot Pr_T^{0,43} \quad (5.45)$$

Критерій Прандтля за формулою 5.38:

де $\mu_T = 1,000 \cdot 10^{-3} \text{ Па} \cdot \text{с}$ – коефіцієнт динамічної в'язкості теплоносія при температурі $t_T = 28^\circ\text{C}$,

$C_T = 3820 \text{ Дж/кг} \cdot \text{К}$ – питома теплоємність теплоносія при $t_T = 28^\circ\text{C}$,

$\lambda_T = 0,599 \frac{\text{Вт}}{\text{м} \cdot \text{К}}$ – питома теплопровідність теплоносія при $t_T = 28^\circ\text{C}$.

$$Pr_T = \frac{1,000 \cdot 10^{-3} \cdot 3820}{0,599} = 6,377.$$

Тоді:

$$Nu_T = 0,037 \cdot (675,2)^{0,8} \cdot 6,37^{0,43} = 15,05.$$

Для визначення поверхні теплообміну необхідно знайти коефіцієнт тепловіддачі від теплоносія у сорочці та від середовища у посівному апараті та коефіцієнт теплопередачі.

$$\alpha_T = \alpha_{T1} \left(1 + 3,54 \frac{d_{екв}}{D_{cp}} \right) \quad (5.46)$$

α_{m1} визначаємо з формули 5.41:

$$\alpha_{T1} = \frac{15,05 \cdot 0,599}{0,062} = 145,4 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}.$$

Тоді:

$$\alpha_T = 145,4 \cdot \left(1 + 3,54 \frac{0,062}{0,8561} \right) = 182,7 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К}.$$

Коефіцієнт теплопередачі становить:

$$K = \frac{1}{\frac{1}{\alpha_c} + \frac{\delta_{ст}}{\lambda_{ст}} + \frac{1}{\alpha_T}} \quad (5.47)$$

де $\lambda_{ст} = 16 \text{ Вт/м} \cdot \text{К}$ – теплопровідність стінки,

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		97

$$K = \frac{1}{\frac{1}{3901} + \frac{0,01}{16} + \frac{1}{182,7}} = 157 \text{ Вт/м}^2 \cdot \text{К.}$$

Розрахункова поверхня теплообміну:

$$F_p = \frac{Q}{K \cdot \Delta t_{\text{ср}} \cdot \tau_{\text{пр}}} \quad (5.48)$$

$$F_p = \frac{11,38 \cdot 10^6}{157 \cdot 10 \cdot 172800} = 0,426 \text{ м}^2.$$

Дійсна поверхня теплообміну:

$$F_d = \pi D H_c \quad (5.49)$$

$$H_c = H_p - h_{\text{дн}};$$

$$H_c = 0,478 - 0,240 = 0,238 \text{ м.}$$

Тоді :

$$F_d = 3,14 \cdot 0,8 \cdot 0,238 = 0,598 \text{ м}^2.$$

Умова теплообміну виконується, оскільки:

$$F_p < F_d.$$

$$0,426 \text{ м}^2 < 0,598 \text{ м}^2$$

Можна зробити висновок, що поверхня теплообміну сорочки апарата забезпечить заданий температурний режим протягом його роботи.

5.2.5 Розрахунок процесу перемішування в системах рідина-газ і рідина-тверде тіло

Розрахуємо геометричні розміри барботеру. Висота перемішуючого пристрою над барботером становить:

$$h_{\delta} = 0,25 \cdot d_m \quad (5.50)$$

$$h_{\delta} = 0,25 \cdot 0,28 = 0,07 \text{ м.}$$

Діаметр барботеру [71]:

$$D_0 = (0,5 \div 0,75)$$

$$D_0 = 0,5 \cdot 0,28 = 0,14 \text{ м.}$$

Діаметр отворів барботеру:

$$d_0 = 25 \text{ мм} = 0,025 \text{ м.}$$

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		98

Кількість отворів в барботері:

$$z_{\text{отв}} = \frac{4V_{\Gamma}}{\pi d_0^2 W_0} \quad (5.51)$$

де $V_{\Gamma} = 3 \text{ м}^3/\text{с}$. Приймаємо $W_0 = 20 \text{ м/с}$, тоді [13] :

$$z_{\text{отв}} = \frac{4 \cdot 3}{3,14 \cdot 0,025^2 \cdot 20} = 306 \text{ (отвор)}.$$

Кількість отворів в одному ряду становить:

$$z_{\text{отв}_1} = \frac{\pi D_0}{t_{\text{отв}}} \quad (5.52)$$

Приймаємо відстань між отворами $t_{\text{отв}} = 0,1 \text{ м}$.

Тоді кількість отворів в одному ряду становить

$$z_{\text{отв}_1} = \frac{3,14 \cdot 0,21}{0,1} = 9 \text{ (отворів)}.$$

Сумарна площа поперечного перерізу отворів барботера:

$$S_{\text{отв}} = \frac{\pi}{4} d_0^2 \cdot z_{\text{отв}} \quad (5.53)$$

$$S_{\text{отв}} = \frac{3,14}{4} \cdot 0,025^2 \cdot 306 = 0,15 \text{ м}^2.$$

5.2.6 Розрахунок насосу

Основною задачею при гідравлічних розрахунках насосів є визначення необхідного напору і потужності двигуна при заданій витраті рідини. Вибір насосу проводиться за каталогами чи ГОСТами з урахуванням властивостей рідин, що переміщуються.

Необхідний напір насосу:

$$H_1 = \frac{\Delta P_1}{\rho_1 \cdot g} \quad (5.54)$$

Для визначення гідравлічного опору сорочки теплообміну необхідно розрахувати коефіцієнти гідравлічного опору для теплоносію.

$$\xi_1 = \frac{17}{Re_T^{0,25}} \quad (5.55)$$

$$\xi_1 = \frac{17}{62,55^{0,25}} = 6,04$$

Розрахунок гідравлічного опору теплообмінника по потоку теплоносіїв:

$$\Delta P_1 = \frac{x_1 \cdot \xi_1 \cdot \left(\frac{L}{d_{\text{екв}}}\right) \xi_1 \cdot (\rho_1 \cdot w_1)^2}{2} \quad (5.56)$$

$$\Delta P_1 = \frac{3 \cdot 6,04 \cdot (0,1 \cdot 0,0719) \cdot (996 \cdot 0,0033)^2}{2} = 405,4 \text{ Па}$$

Отже:

$$H_1 = \frac{405,4}{996 \cdot 9,81} = 0,041 \text{ м.}$$

Корисна потужність, що затрачується на переміщення середовища:

$$N_{n1} = (\rho_1 \cdot g \cdot H_1) / 1000 \quad (5.57)$$

$$N_{n1} = (996 \cdot 9,81 \cdot 0,041 \cdot 0,0046) / 1000 = 0,02 \text{ кВт.}$$

Потужність, яку повинен розвинути електродвигун насоса на вихідному валу при установленому режимі роботи:

$$N_{\text{дв}1} = N \cdot \frac{n_1}{\eta_n} \quad (5.58)$$

$$N_{\text{дв}1} \cdot \frac{0,02}{0,6} = 0,031$$

де $\eta_n = 0,6$ – коефіцієнт корисної дії для насоса середньої продуктивності.

Потужність, яку споживає двигун від мережі при $\eta_{\text{дв}} = 0,7$:

$$N_1 = \frac{N_{\text{дв}}}{\eta_n} \quad (5.59)$$

$$N_1 = \frac{0,031}{0,7} = 0,045 \text{ кВт.}$$

Враховуючи коефіцієнт запасу потужності $\beta=2$, встановимо двигун потужністю:

$$N_{\text{ус}1} = N_1 \cdot \beta \quad (5.60)$$

$$N_{\text{ус}1} = N_1 \cdot \beta = 0,045 \cdot 2 = 0,09 \text{ кВт}$$

За отриманими величинами обираємо консольний насос К 100-65-125 (25 м³/год або 0,007 м³/с), напором 20 м за ГОСТ 22247-96 [72].

5.3 Вибір загальнозаводського обладнання

Вибір насосів

Згідно розрахунків у пункті 5.2, обираємо за ГОСТ 22247-96 консольний насос – К 100-65-125 ($25 \text{ м}^3/\text{год}$ або $0,007 \text{ м}^3/\text{с}$) з напором 20 м [72].

Допустиме надлишковий тиск рідини на вході в консольні насоси з сальниковим ущільненням не повинно бути більше 0,35 МПа ($3,5 \text{ кг}/\text{см}^2$), а на вході в консольні горизонтальні з ущільненням торця і підвищувальні насоси – 0,6 МПа ($6,0 \text{ кг}/\text{см}^2$).

Вибір калориферів

Згідно розрахованої площі теплообміну обираємо потрібний калорифер за КВс1-П. Габаритні розміри: А=530 мм; Б=378 мм, діаметр умовного проходу патрубків – 32 мм; число кроків 4 та 2; маса однієї секції – 43,9 кг [73].

Вибір дозаторів

Було обрано масовий рідинний дозатор ДЖМ-1, який застосовується для дозування рідких продуктів в готову тару. Дозування здійснюється об'ємним способом. Устаткування працює в напіваавтоматичному режимі, та потребує від оператора встановлення тари, подачі команди на початок дозування, і приймання заповненої тари. Має наступні характеристики: електроживлення – 220/50 В /Гц; потужність – 0,5 кВт/год; вага – до 50 кг; габаритні розміри – 600/800 /1600; продуктивність – 2500 л/год; діапазон дозування – від 200 мл. Виготовлений з полірованої сталі AISI 430 [74].

5.4 Вимоги до охорони праці та навколишнього середовища

З підприємств фармацевтичного і біотехнологічного виробництва в атмосферу можуть викидатися летючі органічні сполуки, кислотні гази і тверді

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						101
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

частинки, причому це відбувається як з точкових джерел, так і при неконтрольованому виділенні. У зв'язку з цим необхідно згадати також викиди парникових газів.

Леткі органічні сполуки

Найбільш істотними джерелами викидів летючих органічних сполук (ЛОС) є виробничі процеси хімічного синтезу і екстракції. При первинному фармацевтичному виробництві викиди ЛОС відбуваються з випускних отворів реакторів, фільтраційних систем в процесі сепарації, в формі парів розчинників з рафінаційних ємностей і сушарок (включаючи операції навантаження і розвантаження), у формі неконтрольованих викидів з клапанів, резервуарів, насосів та іншого обладнання (наприклад, центрифуг), в формі розчинників і інших ЛОС, пов'язаних з вилучаються хімічними речовинами при екстракції природних продуктів, у формі розчинників в процесах, пов'язаних з попередньою ферментацією і ферментацією, а також з установок для збору та очистки стічних вод. Викиди ЛОС при вторинному фармацевтичному виробництві можуть утворюватися в результаті змішування, хімічної сполуки, грануляції, в результаті операцій, що передбачають застосування розчинників або спиртових сумішей, а також при виробництві аерозолів.

Заходи щодо запобігання і зведення до мінімуму викидів розчинників і ЛОС включають таке:

- зниження обсягу або заміщення використання розчинників і інших матеріалів з високим вмістом ЛОС, заміна їх продуктами з більш низькою летючість і перехід до використання оболонок і очисних розчинів на водній основі;
- здійснення програм запобігання і контролю витоку ЛОС з працюючого обладнання, як описано в Загальному керівництві по ОСЗТ («Викиди в атмосферу і якість навколишнього повітря: неконтрольовані джерела»);
- здійснення програм запобігання і контролю втрати ЛОС з відкритих ван і в процесі змішування, включаючи установку технологічних

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						102
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

конденсаторів нижче виробничого обладнання за технологічною лінії для забезпечення переходу продукту з газоподібного в рідкий стан і відновлення розчинників

- зниження, по можливості, температури робочих процесів;
- використання водо- і газозуловлююче обладнання замкнутого циклу для чищення реакторів і іншого обладнання ЛОС повинні вловлювати витяжними ковпаками місцевої вентиляції для подальшого контролю точкових і неконтрольованих викидів. Екстракція і контроль викидів ЛОС, особливо при процесах ферментації, може також скорочувати неприємні запахи.

Рекомендовані заходи по контролю викидів ЛОС включають наступне:

- видалення викидів з стерилізаційних камер в контрольні пристрої;
- конденсацію і дистиляцію розчинників, які виділяються з реакторів або дистиляційних установок. Можлива установка кріогенних конденсаторів для зменшення температури газового потоку нижче точки роси з метою підвищення ефективності відновлення ЛОС;
- установку мокрих скрубєрів (або газобирачів), здатних видаляти, як ЛОС, так і інші газоподібні забруднювачі з газового потоку, а також додавання в скрубєр гіпохлориту для зниження виділення неприємних запахів.

Тверді частинки

Тверді частинки, що містяться у кінцевому продукті або напівфабрикату, здатні виділятися під час виробництва. Найбільш поширеними джерелами твердих частинок є операції розуміли, змішування, хімічної сполуки, приготування складів, таблетування та упаковки.

Рекомендовані заходи по контролю викидів твердих речовин включають таке:

- збір твердих частинок за допомогою установок повітряного фільтрації і їх рециркулювання в технологічний процес приготування в залежності від вимог до даного продукту і параметрів технологічного процесу;
- встановлення камери для знешкодження відходів: в камері тверді частинки будуть видалятися з повітря та буде знижуватись швидкість потоку;

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						103
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- для запобігання перехресного забруднення встановлення високоефективних повітряних фільтрів в системи вентиляції, кондиціонування та обігріву для контролю викидів твердих частинок, як всередині й зовні. Вентиляційні повітроводи повинні бути відокремлені один від одного в цілях запобігання перехресного забруднення від різних технологічних процесів і полегшення очищення повітряного потоку;

- збір твердих частинок за допомогою установок повітряного фільтрації, як правило, з рукавними/тканинними фільтрами;

- в залежності від обсягу викидів і переважаючого розміру часток необхідно вивчити додаткові методи контролю викидів твердих частинок, такі як мокрі скрубери і мокрі електростатичні пиловловлювачі, особливо після очищення шляхом спалювання/термічного окислення.

Стічні води

Технологічні стічні води

В залежності від технологічного процесу стічні воду и біотехнологічному та фармацевтичному виробництві можуть містити: воду від промивання продукту; стоки, які утворились при хімічних реакціях; відпрацьовані кислотні та лужні стоки; стоки скрубєрів очищення повітря; стоки конденсату від процесів стерилізації та очищення; стоки від очищення обладнання та виробничих приміщень; а також стоки від миття.

Одними з головних контрольованих параметрів забруднюючих речовин в стічних водах, що утворюються в ході первинних виробничих процесів (наприклад, ферментації, хімічного синтезу, кристалізації, біологічної/природного екстракції), є біологічна потреба в кисні (БПК), хімічна потреба в кисні (ХПК), загальний вміст зважених твердих речовин, показник рН, токсичність, вміст аміаку, біорозчинність. Вони можуть містити й інші різні хімічні сполуки, включаючи розчинники, органічні та неорганічні кислоти, органічні галогеніди, аміак, ціанід, толуол і активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ).

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		104

Рекомендовані заходи по скороченню джерел забруднення включають таке:

- заміщення матеріалів, зокрема застосування біорозчинних матеріалів на водній основі замість органічних матеріалів на основі розчинників
- використання процесів конденсації і сепарації для вилучення відпрацьованих розчинників: фракціонування дистиляції для видалення низькокипятих з'єднань з потоку стічних вод; видалення летючих сполук з потоку стічних вод шляхом відгону інертними газами і подальшої конденсації; екстракції розчинників з органічних з'єднань (наприклад, з'єднань з високим або стійким змістом галогенів і високим рівнем ГПК);
- поєднання потоків відпрацьованих розчинників для оптимізації їх очищення.

Очищення технологічних стічних вод

Методи очищення технологічних стічних вод в цій галузі включають поділ стоків в залежності від джерел забруднення, з попереднім очищенням концентрованих стоків, особливо тих, в яких присутні активні інгредієнти.

Типові методи очищення стічних вод включають застосування: жируловлювачів, піновідстійників, флотаторів пневматичного типу і водомасляних сепараторів для відділення масел і спливаючих твердих частинок; фільтраційних установок для відділення твердих частинок; а також осадження зважених твердих частинок з використанням освітлювачів; біологічну, як правило аеробну, очистку для зниження вмісту розчинних органічних речовин (БПК); видалення біологічних поживних речовин для зниження вмісту азоту і фосфору; хлорування стоків в разі потреби дезінфекції; зневоднення відходів очищення і їх розміщення в спеціально обладнаних місцях, призначених для захоронення небезпечних відходів.

Можуть знадобитися додаткові технічні засоби контролю з метою: а) уловлювання і очищення в водоочисній системі летючих органічних речовин, що виділяються при роботі різних технологічних установок, б) видалення металів за допомогою мембранної фільтрації в розчиненої формі чи інших

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						105
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

методів фізико-хімічної очистки; в) видалення активних інгредієнтів та стійких органічних речовин з використанням активованого вугілля або передових методів хімічного окислення; г) зменшення токсичності відходів за допомогою належних технологічних методів (таких, як зворотний осмос, іонний обмін, активоване вугілля і т. д.), д) зменшення мінералізації стоків за допомогою методів зворотнього осмосу або випаровування, а також ві) локалізації і нейтралізації неприємних запахів.

Біобезпека

Для проектів і підприємств в сфері наукових досліджень, виробництва або торгівлі живими модифікованими організмами ризику, пов'язані з їх вирощуванням, зберіганням, транспортуванням, застосуванням та роботою з ними, можуть включати загрози для біологічного різноманіття в зв'язку з контрольованим або неконтрольованим попаданням такого організму в навколишнє середовище.

Рекомендовані заходи щодо забезпечення біобезпеки включають наступне:

- розробку заснованого на оцінці ризиків підходу до визначенню основних контрольних точок виробничого циклу, включаючи роботу з модифікованими організмами всередині підприємства, їх транспортування і використання за межами підприємства. Зазначена оцінка повинна охоплювати застосовувані технологічні процеси і можливе потрапляння організмів в навколишнє середовище (в тому числі живих модифікованих організмів) в частині збереження і сталого використання біологічного різноманітності з урахуванням ризиків для здоров'я людини;

- здійснення внутрішньозаводських і транспортних заходів безпеки, включаючи спеціальну підготовку персоналу, первинну захист (наприклад, захисні бар'єри) і вторинну захист (наприклад, повітряні шлюзи, різниця в тиску, фільтри витяжних систем і очищення забруднених матеріалів і компанії по селекції, вирощування та утримання тварин і її постачальників повинні

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		106

розроблятися і експлуатуватися відповідно до методами, сертифікованими на міжнародному рівні [75].

Виробниче обладнання повинно відповідати вимогам безпеки згідно ГОСТ 12.2.003-91. Безпека виробничого обладнання залежить від:

1) вибору принципів дії та конструктивних рішень, джерел енергії та характеристик енергоносіїв, параметрів робочих процесів, системи управління і її елементів;

2) мінімізації споживаної та накопичуваної енергії при функціонуванні обладнання;

3) вибору комплектуючих виробів і матеріалів для виготовлення конструкцій, а також застосовуваних при експлуатації;

4) вибору технологічного процесу;

5) застосування вбудованих в конструкцію засобів захисту робітників, а також засобів інформації, що попереджають про виникнення небезпечних (у тому числі пожежовибухонебезпечних) ситуацій;

6) надійності конструкції та її елементів (в тому числі засобів захисту та інформації, дублюванням окремих систем управління, відмови яких можуть привести до створення небезпечних ситуацій);

7) застосування засобів автоматизації, механізації (автоматичне регулювання параметрів робочих процесів) дистанційного управління та контролю;

8) можливості використання засобів захисту, які не входять в конструкцію;

9) виконання ергономічних вимог;

10) обмеження фізичних і нервовопсихологічних навантажень на робітників.

Конструкція апаратів з механічними пристроями вертикальні в частині забезпечення безпеки праці та охорони здоров'я повинна відповідати вимогам ГОСТ 12.2.003 [75].

При розробці апаратів, що працюють під надлишковим тиском, і апаратів для вибухонебезпечних виробництв повинні бути враховані відповідно вимоги

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						107
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

«Правил будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском» і «Загальних правил вибухобезпеки для вибухопожежонебезпечних хімічних, нафтохімічних і нафтопереробних виробництв» [76].

Вибір електрообладнання повинен здійснюватися відповідно до вимог – Правил улаштування електроустановок (ПУЕ). Електрообладнання для апаратів - має відповідати вимогам ГОСТ 12.1.019, ГОСТ 12.2.007.0, ГОСТ 12.2.007.1, ГОСТ 17494 і ГОСТ 14254.

Заземлення апаратів з електроприводами має відповідати вимогам ГОСТ 12.1.030, ГОСТ 12.2.007.0 та Правил улаштування електроустановок (ПУЕ).

Конструкція заземлюючих затискачів, розміщення і розміри знаків заземлення - по ГОСТ 21130. Заземлювальні пристрої, призначені для захисту апаратів від статичної електрики, слід, як правило, об'єднувати з заземлюючими пристроями для електрообладнання.

Апарати повинні бути герметичні по відношенню до зовнішньому середовищі. Гранично допустима концентрація шкідливих речовин в повітрі зони обслуговування апаратів, а також всередині апаратів після їх розтину для огляду і ремонту, не повинні перевищувати значень, наведених в ГОСТ 12.1.005.

					ДП 6215 00 000 ПЗ	Арк.
						108
Зм.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ВИСНОВОК

1. В проекті для виробництва іммобілізованого ензибіотику обрано продуцент *Streptomyces albus* 2435/М з продуктивність 5000 мкг/мл.

2. Проаналізовано методи селекції промислових штамів-продуцентів гідролітичних ферментів та запропоновано схему отримання продуценту шляхом обробки мутагеном у встановлених ефективних дозах: N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину з концентрацією – 1 мг/см³ протягом 20 хвилин.

3. Враховуючи фізіолого-біохімічні особливості *S. albus* 2435/М обрано склад поживного середовища для виробничого біосинтезу на основі меляси та соєвого борошна, а також визначені раціональні параметри культивування: температура 28±1С, перемішування при 220 об/хв, тривалість 72 год.

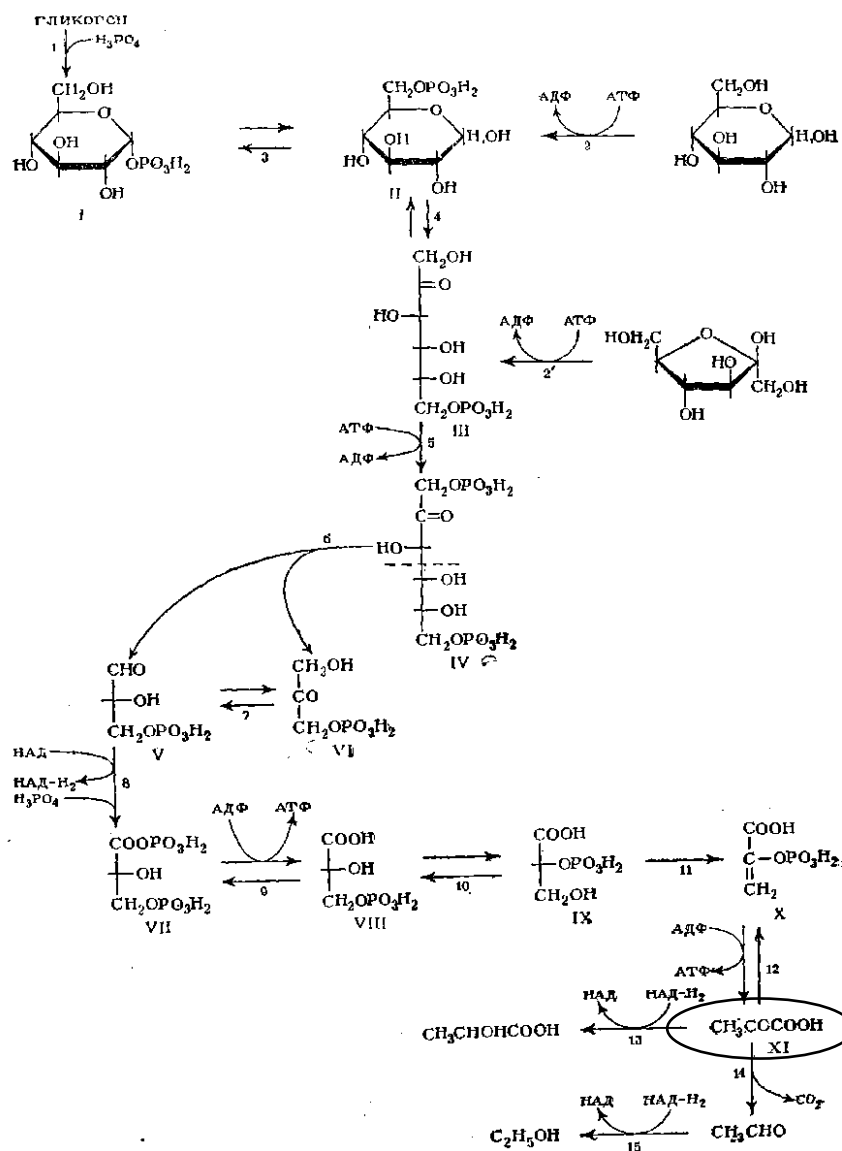
4. Відповідно до визначених фізико-хімічних та біологічних характеристик продукту для його сушіння обрана конструкція розпилювальної сушарки, яка дозволяє отримати препарат належної якості. Температура на вході сушарці 150°С, на виході - 90°С, час сушіння – 1-2 хвилини.

5. Запропоновано використання аеросилу як наповнювач-стабілізатор ферментного комплексу, що обумовлює підвищення його стабільності та активності, а також додаткову сорбційну здатність щодо токсинів. Аеросил використовують марки А-300 з концентрацією 5% та час процесу іммобілізації 30-45 хвилин.

6. Відповідно до вимог до готової форми та якості продукту, розроблено технологічну та апаратурну схеми виробництва іммобілізованого ензибіотику в поліетиленові пакети та коробки по 0,5 кг.

					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВИСНОВОК	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.		Скобєлєва С.Р.				Д	109	120
Консультант						КПІ ім. Ігоря Сікорського ФБТ		
Керівник		Тодосіючик Т.С.						
Затверд.								

Схема розщеплення цукрів до схеми піровиноградної кислоти по схемі
Ембдена-Мейергофа-Парнаса

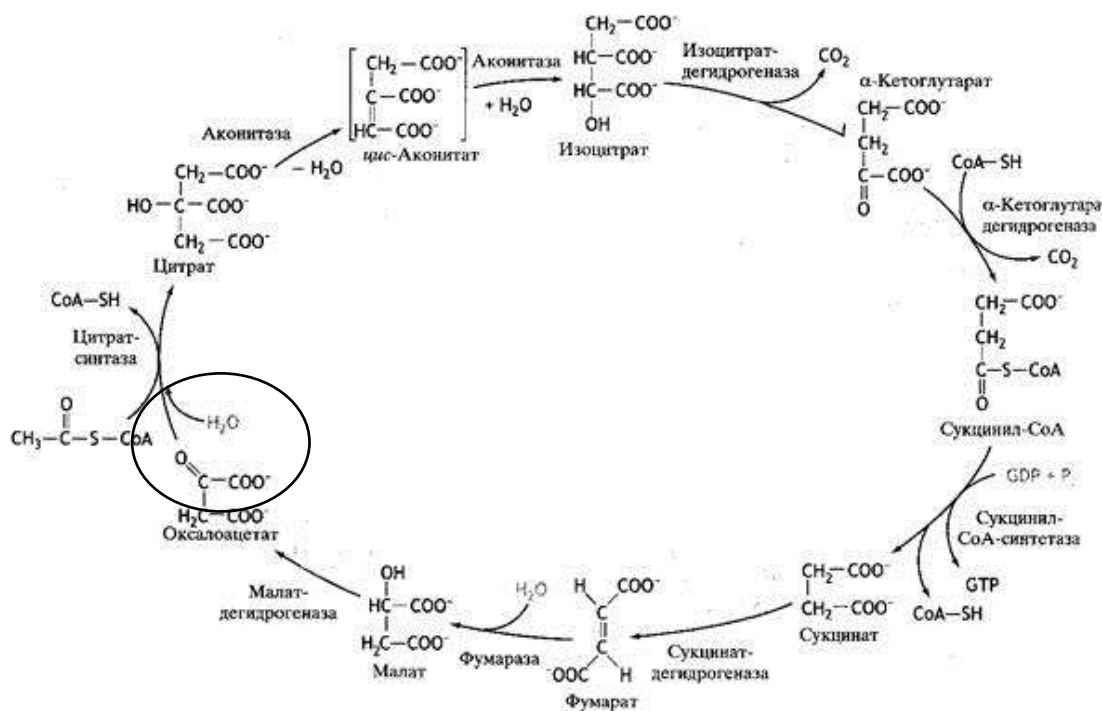


1 — α -глюкан-фосфорилаза; 2, 2' — гексокиназа; 3 — фосфоглюкомутаза; 4 — глюкозофосфат-изомераза; 5 — фосфофруктокиназа; 6 — альдолаза; 7 — триозофосфат-изомераза; 8 — глисераль-дегидрофосфат-дегидрогеназа; 9 — фосфоглицират-киназа; 10 — фосфоглициромутаза; 11 — фосфо-пируват-гидратаза; 12 — пируват-киназа; 13 — лактат-дегидрогеназа; 14 — пируват-декарбоксила-за; 15 — алкоголь-дегидрогеназа.

I – α-D-глюкозо-1-фосфат; II – β-D-глюкозо-6-фосфат; III – D-фруктозо-6-фосфат; IV – D-фруктозо-1,6-дифосфат; V – 3-фосфоглицериновый альдегид; VI – диоксанацетонфосфат; VII – 1,3-дифосфоглицериновая кислота; VIII – 3-фосфоглицериновая кислота; IX – 2-фосфоглицериновая кислота; X – фосфосилицикопропановая кислота; XI – нировиноградная кислота.

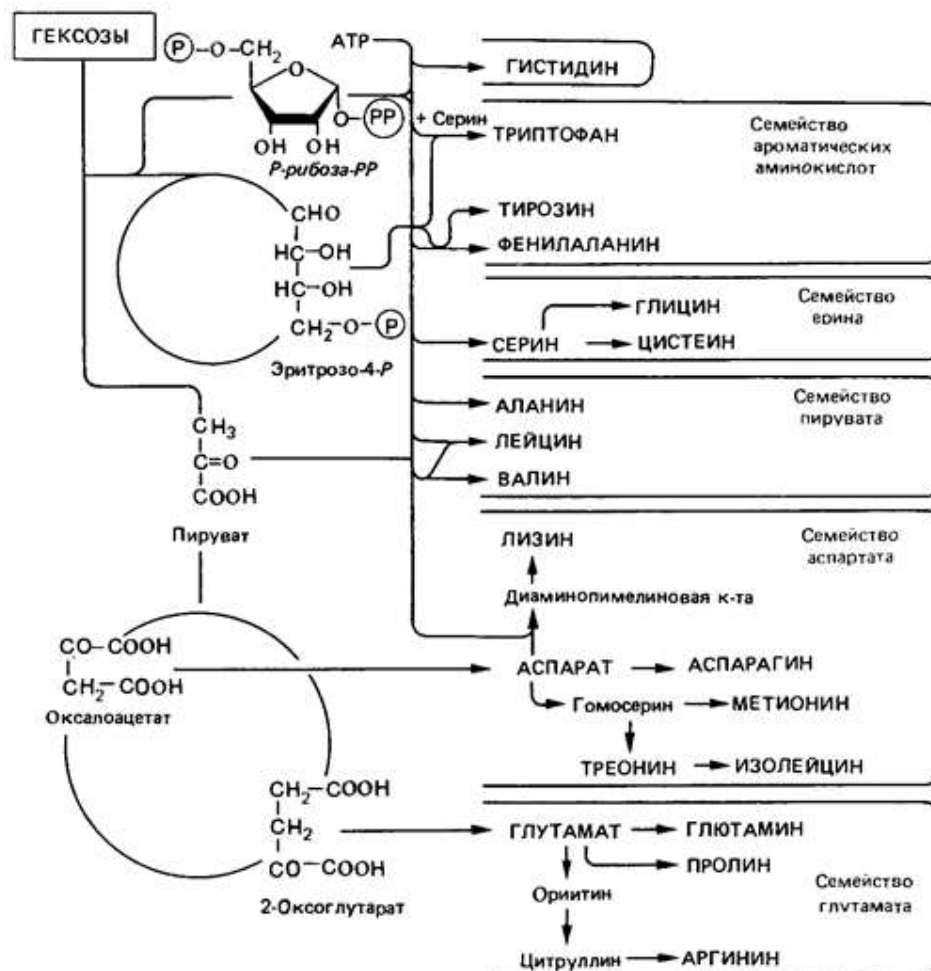
					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Додаток А	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Скобєлева С.Р.					Д	118	120
Консультант								
Керівник	Тодосіючук Т.С.							
Затверд.						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		

Схема катаболізму м'яси, як компоненту поживного середовища
культурою *S. Albus 2435/M* в процесі культивування



					ДП 6215 00 000 ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Додаток Б	Стадія	Аркуш	Аркушів
Розроб.	Скобєлева С.Р.					Д	119	120
Консультант						КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		
Керівник	Тодосіючук Т.С.							
Затверд.								

Синтез амінокислот



					ДП 6215 00 000 ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	Додаток В		
Розроб.	Скобелева С.Р.						
Консультант							
Керівник	Тодосічук Т.С.						
Затверд.							
					Стадія	Аркуш	Аркушів
					д	120	120
					КПІ ім. Ізгоря Сікорського ФБТ		